

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS QUE MEDIAN
LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR DIFERENTES TIPOS
DE ACETOGENINAS DE ANNONACAEAS EN LÍNEAS
TUMORALES HUMANAS**

Nuria de Pedro Montejo

Madrid, 2010

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

**Caracterización de los mecanismos que median la muerte
celular inducida por diferentes tipos de Acetogeninas de
Annonaceas en líneas tumorales humanas**

Doctorando: Nuria de Pedro Montejo.

Licenciada en Ciencias Biológicas

Directores de tesis: Fernando Pelaéz Pérez

Jose Rubén Tormo Beltrán

Tutor: Carmen Aragón Rueda

A mis padres y a mi bubu

“Las cosas podían haber acaecido de cualquier
otra manera y, sin embargo, sucedieron así.”

El camino, Miguel Delibes

Dr. **FERNANDO PELÁEZ PÉREZ**, Director del Programa de Biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), como co-director,

CERTIFICA:

Que **Dña. Nuria de Pedro Montejo**, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado el trabajo titulado **“Caracterización de los mecanismos que median la muerte celular inducida por diferentes tipos de acetogeninas de Annonaceas en líneas tumorales humanas”**. El trabajo ha sido realizado bajo mi co-dirección y reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor en Biología, a cuyos efectos será presentado en la Universidad Autónoma de Madrid, por lo que autorizo su presentación ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Madrid, a 1 de diciembre de 2010




Fernando Peláez, Ph.D.

Director
Programa de Biotecnología

José RUBÉN TORMO BELTRÁN
Associate Area Head
Tel.: 958 993 965 Ext 7055
e-mail: jrtormo@medinaandalucia.es

FUNDACIÓN MEDINA
Parque Tecnológico Ciencias de la Salud
Avda Conocimiento, 3 - 18100 Granada



Dr. JOSÉ RUBÉN TORMO BELTRÁN, Líder de Área Asociado de la **Fundación MEDINA**, *Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía*, en Granada, como codirector,

CERTIFICA:

Que **Dña Nuria DePedro Montejo**, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado el presente trabajo '**Caracterización de los mecanismos que median la muerte celular inducida por diferentes tipos de acetogeninas de Annonaceae en líneas tumorales humanas**'. Dicho trabajo reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al Grado de doctor en Biología y, a cuyos efectos, será presentado en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo, realizado bajo mi codirección, se encuentra plenamente autorizado para su presentación ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste, se extiende el presente certificado en
Granada a 30 de Noviembre de 2010.



Fundación MEDINA

José R Tormo, PhD
Associate Area Head

Fundación MEDINA
Avda del Conocimiento 3
Parque Tecnológico Ciencias de la Salud
18100 Armilla, Granada, España

Escribir esto significa que la tesis por fin “ha terminado” y este es el momento de agradecer a todas las personas que han participado en la elaboración de esta tesis doctoral. Han sido muchas las personas que han estado a mi lado animándome y dándome su apoyo para poder terminarla, y espero poder reflejar mi más sincero agradecimiento por todo ello, además, esta es una de las partes (o la única) que gran parte de mis amigos leerá.

En primer lugar quería agradecer a mis directores de tesis por su infinita paciencia y apoyo durante este tiempo. A Fernando Peláez, no solo por hacer posible esta tesis, sino por todos estos años de apoyo. A él le debo mi trayectoria profesional, gracias por darme aquella primera oportunidad, a la que se sumaron muchísimas más. A Rubén Tormo por sus palabras de ánimo y por su amistad durante todos estos años. Por aceptar la dirección de esta tesis, por todos esos detalles que le hacen ser tan especial. Mil gracias a Olga Genilloud por hacer posible este sueño y por contar conmigo en esta nueva etapa. A Francisca Vicente por su apoyo incondicional en todo, por preocuparse como nadie por mi futuro. A Carmen Aragón por echarnos una mano siempre durante la tesis, por aguantar nuestras prisas del último momento.

A mis padres, por apoyarme siempre, en mis buenas y malas decisiones, por heredar de ellos la fuerza de voluntad y entusiasmo por hacer las cosas y por enseñarme a luchar por lo que uno quiere. A mi hermano y a Marian por estar siempre ahí, simplemente por ser maravillosos. A la princesa de la familia, Erin y a las dos pequeñas “tanacas”, Olaya y Ahinara, porque sus sonrisas y abrazos me dan la energía necesaria para cualquier cosa.

A mis tíos, Fernando y Nines, por ser como unos segundos padres, por todos los momentos buenos a lo largo de mi vida. A Soni, “mi hermana pequeña”, por todas esas horas al teléfono aguantando la vida de *cherimolin* (gracias telefónica por tus ofertas, jejejeje). A Fernan y Susi, por todos esos momentos inolvidables, a Susi por su inestimable ayuda con las fotos de esta tesis. A Javi y Bea por organizar esas locuras de reuniones familiares. Al resto de mi familia por cada apoyo que he recibido.

A todos los enanos, Fer (mi Charlie Winter), Diego, Iván, Claudia, Marcos, Quique, Carlos, Álvaro y Silvia, por su alegría desbordada, por sus abrazos y sus besos.

A mis amigos de siempre, Silvia, Belén, Eva, Cesar y Flavien por estar conmigo durante tantísimos años, en los buenos y los no tan buenos momentos. A Cris, por entenderme durante todo este tiempo, por fin, te puedo aportar mi parte en nuestra simbiosis, esta tesis es también tuya. A Luis, por esas estupendas e

irrepetibles “tortillas de camarones”. A Jorge, por su apoyo en estos últimos pasos para alcanzar la cima, por su infinita “paciencia” como entrenador y por ese otro punto de vista de las cosas.

A Josito por su amistad, por esas maravillosas y eternas conversaciones, en fin, por ser como eres. A Belenchu, que aunque no quería “amigos”, te has convertido en una de los mejores que uno puede tener y a Raquel, por su impetuosa forma de vivir. A Antonio, por todos esos momentos compartidos que siempre acaban en cañas. A Gretchen, por su amistad y su enorme corazón. A Laura, por todos esos buenos momentos dentro y fuera de laboratorio, por hacer agradable hasta el momento más estresante.

A Cristina Cuadrillero, por soportarme entonces y por su amistad en la actualidad. A Anita, por todo, desde esos momentos fileteando en el pasillo hasta ahora, por su valiosa ayuda en todo momento y por su cariño, más valioso si cabe. A Dolores, por enseñarme todo lo que sé de cultivos celulares y por contagiarme su pasión por ellos.

A mis compañeros de MEDINA, a Gonza por su consejos, su cariño, por su particular sentido del humor y por todos esos “piropos”. A Paco, por soportar mi braseo constante, por su paciencia en esas explicaciones matemáticas y estadísticas. A Jesús, por compartir esas cañas y por su ayuda. A Nacho, Gerald y Fernando su ayuda siempre que se lo he pedido. A Mike, por sus grandes consejos en esta tesis, por su ayuda con las traducciones, por su amabilidad e interés por este trabajo. A Eric por soportar todas mis quejas y ayudarme en muchos de los trámites de este proceso.

A Angeles, por soportar como nadie mi estrés y mis cambios de humor, por toda su ayuda dentro y fuera del laboratorio; a Juan (Pitirri) por compartir las historias y anécdotas de su vida, A Bastien, por echarme un cable siempre que se lo he pedido, a Nouredine por su ayuda con las ACGs y por su amistad, a Caridad por esa energía desbordante y por llevar siempre una sonrisa. A los cinco, por hacer que un mal día se pueda convertir en algo mucho mejor con sus comentarios y risas.

A Rafa y Vero por compartir esos momentos alrededor de una buena comida o un maravilloso mate. A José, Tachu, Hugo y Vanina, por los buenos momentos compartidos, por apreciar todos esos pequeños detalles del día a día, por enseñarme que: “Miserias como estas... 100 años más”, por vuestra amistad a larga distancia.

A Robolfo, por no romperse durante el proceso de la presente tesis y dejarme acabar.

DE CORAZÓN, MIL GRACIAS A TODOS.

There is an ongoing and unmet need for new anti-neoplastic drugs to combat cancer as we face the reality that certain types of cells are resistant to current chemotherapeutic treatments (Shyng-Shiou *et al.* 2002). Acetogenins (ACGs) are a group of secondary metabolites isolated from species of the *Annonaceae* exhibiting a broad range of biological properties, including cytotoxic, antitumoral, antiparasitic and antimicrobial (Bermejo *et al.* 2005).

Mechanism of action studies have demonstrated that ACGs are among the most potent known inhibitors of the mitochondrial Complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). Despite substantial work exploring the cytotoxic activity of these compounds on tumor cell lines, the correlations between their inhibitory potential with respect to the mitochondrial Complex I and cytotoxicity have not been readily apparent (Royo *et al.* 2003; Tormo *et al.* 2005). ACGs have also been described as inducers of apoptosis, although the mechanisms and factors that modulate their efficacy against cancer cells are yet unknown.

In the present studies, we have used *rotenone*, a classical inhibitor of Complex I, as a model compound. Irreversible binding and inactivation of Complex I of the mitochondrial electron transport chain results in inhibition of oxidative phosphorylation and reduced energy metabolism (Isenberg *et al.* 1999). Furthermore, said inhibition has been shown to increase ROS formation, reduce $\Delta\Psi_m$ and produce a characteristic nuclear morphology typically associated with apoptosis.

We describe herein the *in vitro* cytotoxic activity of 18 ACGs on six tumoral and two normal cell lines. Based on binding characteristics to Complex I and antiproliferative potency, four of these compounds (*cherimolin-1*, *motrilin*, *laherradurin* and *rolliniastatin-1*) were selected to study their effects on the apoptotic cascade in direct comparison with *rotenone*. We observed that ACGs were potent inducers of apoptosis in HepG2 cells, although they do not do so all in the same time frame; we show for example that *rolliniastatin-1* induces cell death after only one hour of incubation whereas the effects by *laherradurin* are not apparent until 24 hours of treatment.

In addition, to further scope out the therapeutic potential of this class of compounds, we have evaluated a first measure of biological safety of ACGs by detailing their behavior on three cardiac ion channels (hERG, Nav1.5, Cav1.2). Our results show that these compounds are able to compete with ligands of these channels, but their effect on their functionality is very limited.

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN.	2
1. ACETOGENINAS DE ANNONACEAS	2
2. LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES (CTE) MITOCONDRIAL	6
3. LAS ACGs COMO INHIBIDORES DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL	8
4. APOPTOSIS	10
4.1. Apoptosis y Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)	13
4.2. Apoptosis y potencial de membrana mitocondrial	14
4.3. Apoptosis y el Poro de Permeabilidad Transitoria Mitocondrial (PPTM)	14
4.4. Apoptosis y flujo de calcio mitocondria – citosol	16
4.5. Apoptosis y Caspasas	16
5. PERFIL DE SEGURIDAD CARDIACA DE CANDIDATOS A FÁRMACOS.	17
5.1. Potencial de Acción (PA) cardiaco	17
5.2. Principales canales iónicos con implicaciones en aspectos de seguridad de fármacos	19
5.2.1. Canales de Na ⁺	19
5.2.2. Canales de Ca ²⁺	20
5.2.3. Canales de K [*]	21
OBJETIVOS.	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. LÍNEAS CELULARES	23
2. PREPARACIÓN DE COMPUESTOS	24
2.1. Preparación de compuestos para el ensayo de citotoxicidad, MTT	24

2.2. Preparación de compuestos para el ensayo de citotoxicidad LDH y en ensayos de estudios de apoptosis	25
2.3. Preparación de compuestos para los ensayos de cardiotoxicidad	25
3. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD.	26
3.1. Determinación de citotoxicidad mediante el ensayo de MTT	26
3.2. Determinación de citotoxicidad mediante el ensayo de LDH	27
4. ESTUDIOS DE APOPTOSIS	28
4.1. Medición de ATP	28
4.2. Medición de especies reactivas de oxígeno (EROs) y superóxidos	29
4.2.1. Medición de especies reactivas de oxígeno (EROs)	29
4.2.2. Medición de radicales superóxidos	30
4.3. Medición del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	30
4.4. Medición de calcio mitocondrial y citosólico	31
4.5. Determinación del papel de poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM)	32
4.6. Medición de actividad Caspasa 9	32
4.7. Medición del grado de condensación de cromatina, permeabilidad de membrana y muerte celular mediante sondas fluorescentes	33
5. ESTUDIOS DE SEGURIDAD DE FÁRMACOS.	34
5.1. Canal de sodio Nav1.5	34
5.2. Canal de calcio tipo L. Cav1.2	36
5.2.1. Ensayos unión receptor-ligando	37
5.2.2. Ensayos funcionales	38
5.3. Canal de potasio hERG	40
5.3.1. Ensayo unión receptor-ligando.	40
5.3.2. Ensayo funcional.	41

RESULTADOS.	44
1. ESTUDIO DE MUERTE CELULAR MEDIANTE EL ENSAYO DE MTT	44
2. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD MEDIANTE EL ENSAYO DE LDH	46
3. DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE ATP CELULAR	50
4. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs) Y SUPEROXIDOS	53
5. COLAPSO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	56
6. IMPLICACIÓN DEL PORO DE PPTM EN LA MUERTE CELULAR MEDIADA POR ACETOGENINAS	58
7. FLUJO DE CALCIO CITOSOL-MITOCONDRIA EN LA APOPTOSIS	60
8. ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-9	61
9. CONDENSACIÓN DE LA CROMATINA, PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA. MUERTE CELULAR	64
10. ESTUDIO DE SEGURIDAD CARDIACA	68
10.1. Canal de sodio Nav1.5	68
10.2. Canal de calcio Cav1.2	69
10.3. Canal de potasio hERG	72
DISCUSIÓN	74
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	91
ARTÍCULOS PUBLICADOS	107

ACG	Acetogenina
NT	No tumoral
CTE	Cadena Transportadora de Electrones
UQ	Ubiquinona
CoQ	Coenzima Q
UQH₂	Ubiquinona reducida
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
PPTM	Poros de Permeabilidad Transitoria Mitocondrial
$\Delta\psi_m$	Diferencia Potencial Mitocondrial
DR	(del inglés, <i>death receptors</i>)
ATP	Adenosín-Tri-Fosfato
ADP	Adenosín-Di-Fosfato
CASPASA	(del inglés, <i>Cysteine-Aspartate Proteases</i>).
CADV	Canal Aniónico Dependiente De Voltaje
TNA	Translocador de Nucleótidos de Adenina
RPB	Receptor Periférico de Benzodiazepinas
UCM	Uniportador de Calcio Mitocondrial
AIF	Factor de Inducción de Apoptosis (Apoptosis Induction Factor)
Apaf-1	(del inglés <i>Apoptosis protease-activating factor-1</i>)
CYA	Ciclosporina A
[Ca²⁺]_m	Concentración de Calcio Mitocondrial
[Ca²⁺]_c	Concentración de Calcio Citosólico
I_{Na}	Corriente de sodio
I_{CaL}	Corriente de calcio, canal tipo L
I_{Kr}	Corriente rápida de potasio
PA	Potencial de Acción
hERG	(del inglés, <i>human ether-à-go-go- related gene</i>)
LDH	Lactato Deshidrogenasa
C-DCDHF-DA	Diadato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetoximetilo)
DHE	Dihidroetidio
JC-1	Ioduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil benzamidazolocarboianina
PI	Ioduro de Propidio
DMSO	Dimetilsulfóxido
RLU	Unidades Relativas de Luminiscencia

1. ACETOGENINAS DE ANNONACEAS (ACGs)

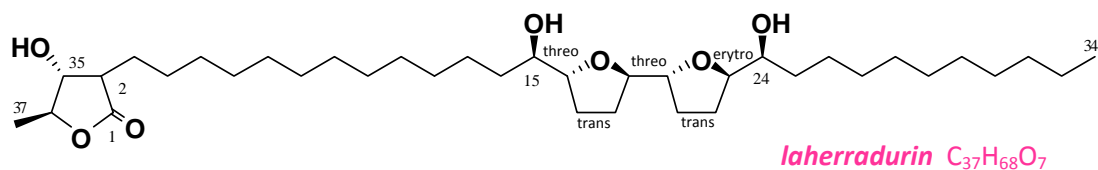
Las ACGs constituyen una familia de metabolitos secundarios aislados exclusivamente de especies de *Annonaceae*, plantas ampliamente extendidas en regiones tropicales y subtropicales. Las ACGs muestran múltiples actividades biológicas, entre las que destacan sus propiedades citotóxicas, antiparasitarias e insecticidas (Zafra-Polo *et al.* 1996).

La primera acetogenina descrita, *uvaricin*, fue obtenida en 1982 a partir de las raíces de *Uvaria acuminata* (Jolad *et al.* 1985). En la actualidad se conocen más de 400 ACGs, todas ellas de especies de la familia *Annonaceae*, por lo que reciben el nombre genérico de *acetogeninas de annonáceas* (ACGs). Las especies a partir de las que se han aislado estos compuestos pertenecen a un grupo reducido de géneros dentro de esta familia: *Annona*, *Asimina*, *Disepalum*, *Goniothalamus*, *Polyalthia*, *Porcelia*, *Rollinia*, *Xylopia* y *Uvaria* (Bermejo *et al.* 2005).

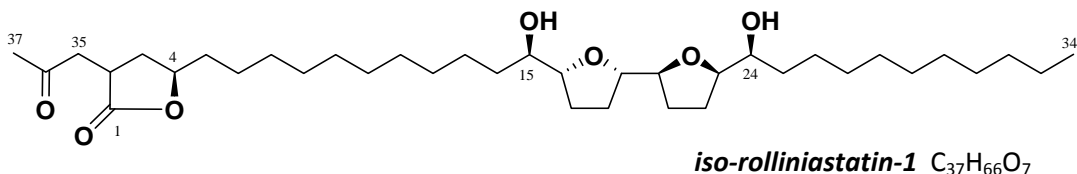
Las ACGs constituyen una familia de productos naturales de 35/37 átomos de carbono que tienen su origen en la vía de los poliacetatos a partir de acetil-CoA. Están constituidas por una larga cadena alquílica cuyo extremo terminal presenta habitualmente una γ -metil- γ -lactona α , β -insaturada. Sobre la cadena hidrocarbonada presentan generalmente uno, dos, o raramente tres, anillos tetrahydrofuránicos, anillos epoxídicos o dobles enlaces (Tormo *et al.* 1999).

En la presente tesis se han utilizado 7 grupos estructuralmente distintos de ACGs naturales, incluyendo algunos derivados semisintéticos:

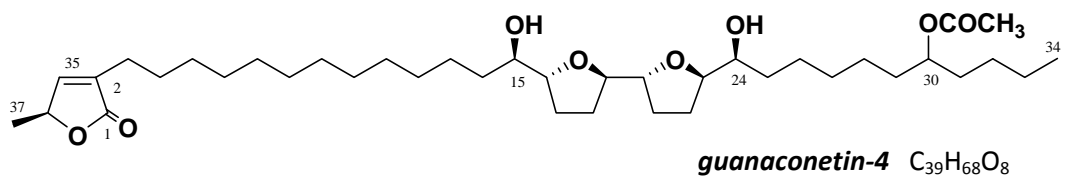
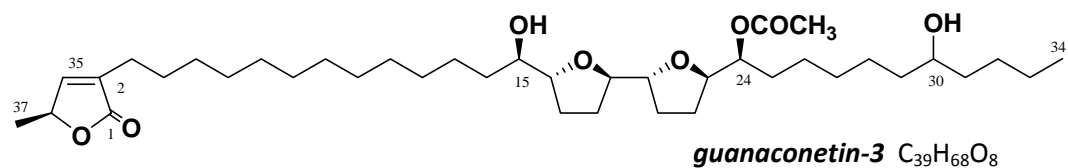
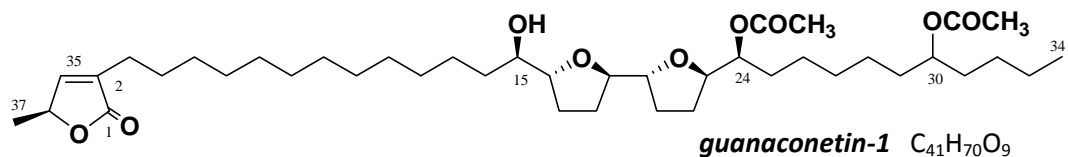
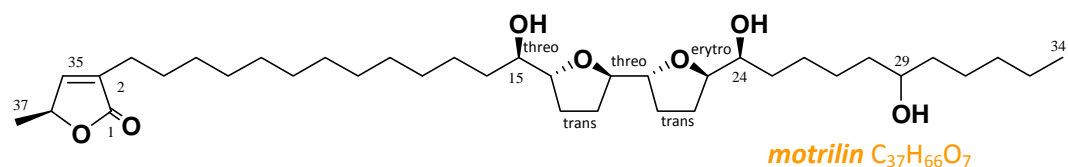
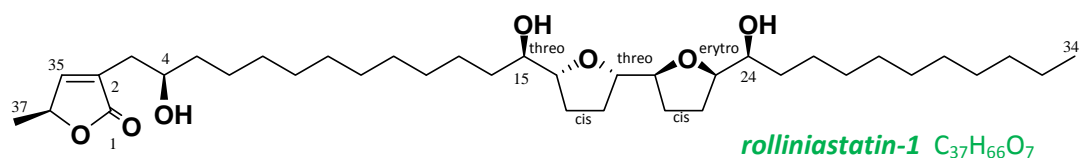
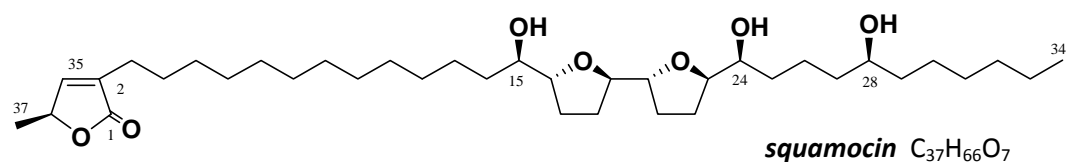
- ACGs bis-tetrahydrofuránicas adyacentes con γ -lactona saturada β -hidroxilada: *laherradurin*.



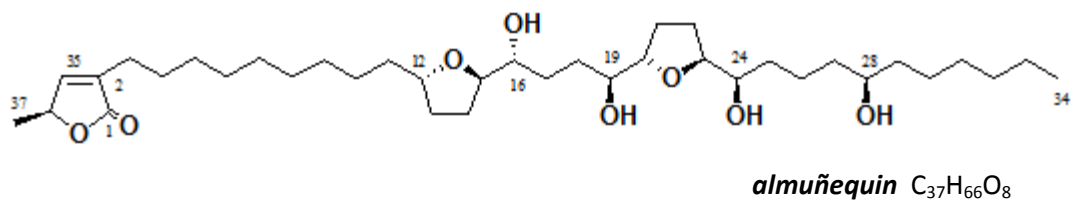
- ACGs bis-tetrahydrofuránicas adyacentes con γ -lactona saturada "tipo iso": *iso-rolliniastatin-1*.

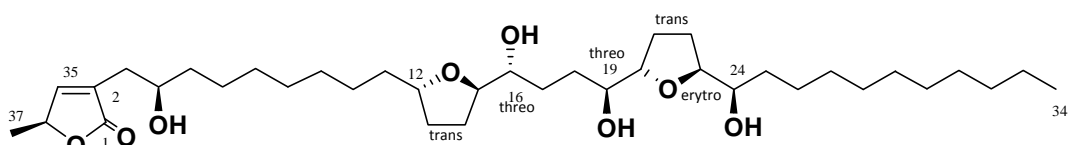
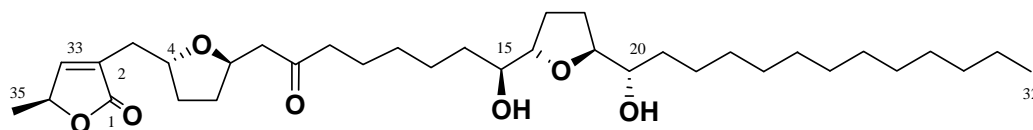


- ACGs bis-tetrahidrofuránicas adyacentes con γ -lactona α,β insaturada: *squamocin*, *rolliniastatin-1*, *motrilin*, *guanaconetin-1*, *guanaconetin-3* y *guanaconetin-4*.

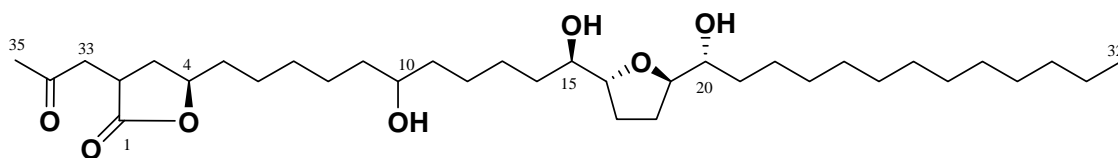
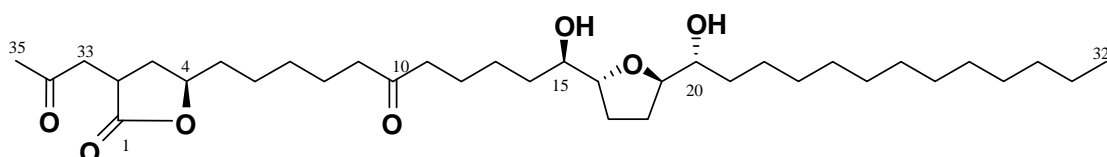


- ACGs bis-tetrahidrofuránicas no adyacentes con γ -lactona α,β insaturada: *almuñequin*, *cherimolin-1* y *aromin*.

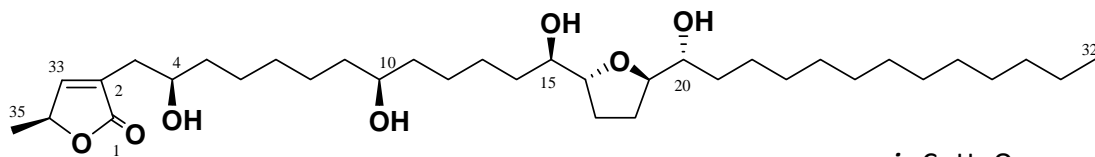
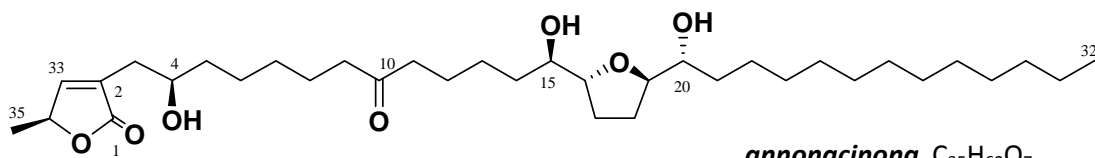


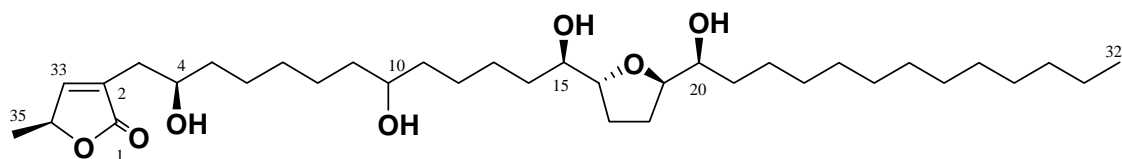
*cherimolin-1* C₃₇H₆₆O₈*aromin* C₃₅H₆₀O₇

- ACGs mono-tetrahydrofuránicas con γ -lactona saturada "tipo iso": *iso-annonacin* e *iso-annonacinona*.

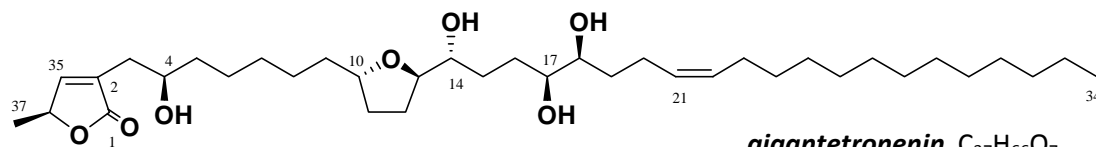
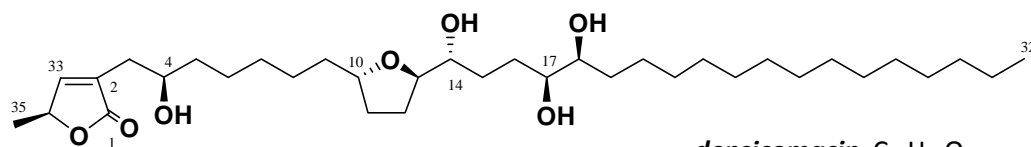
*iso-annonacin* C₃₅H₆₄O₇**i** *iso-annonacinona* C₃₅H₆₂O₇

- ACG mono-tetrahydrofuránicas con γ -lactona α,β insaturada α,α -dihidroxiladas: *annonacinona*, *annonacin* y *annonacin-A*.

*annonacin* C₃₅H₆₄O₇*annonacinona* C₃₅H₆₂O₇

**annonacin-A** C₃₅H₆₄O₇

- ACGs mono-tetrahidrofuránicas con γ -lactona α , β insaturada α -monohidroxiladas:
gigantetronenin y densicomacin.

**gigantetronenin** C₃₇H₆₆O₇**densicomacin** C₃₅H₆₄O₇

Dependiendo del origen vegetal del cual fueron aisladas, se pueden clasificar en 7 subgrupos:

- ACGs aisladas a partir de *Annona aff. spraguei*. *Guanaconetin-1*, *guanaconetin-3* y *guanaconetin-4* fueron aisladas de las semillas de la especie colombiana *Annona aff. spraguei*.
- ACGs aisladas a partir de *Annona cherimolia*. *Annona cherimolia*, más conocida como “chirimoya”, es una fruta comestible originaria de Perú y cultivada en diversas regiones del mundo. Estudios químicos previos sobre las semillas de esta planta, cultivada en una pequeña área pseudo-tropical del sur de España, en la costa de Granada, dieron lugar al aislamiento de *laherradurin*, *motrilin*, *almuñequin* y *cherimolin-1*.
- ACGs aisladas a partir de *Rollinia mucosa*. *Rolliniastatin-1* fue extraída desde semillas de esta especie colombiana. *Iso-rolliniastatin-1* fue un iso-derivado obtenido a partir de *rolliniastatin-1*.
- ACGs aisladas a partir de *Annona densicoma*. De las semillas de *Annona densicoma* fueron aisladas *annonacin* y *annonacinona*, mientras que de su corteza se aislaron otras tres ACGs, *densicomacin*, *iso-annonacin* e *iso-annonacinona*.
- ACGs aisladas a partir de *Annona squamosa*. De sus semillas se obtuvo *annonacin-A* y *squamocin*.
- ACGs aisladas a partir de *Goniothalamus giganteus*. De la su corteza fue aislada la *gigantetronin*.
- ACGs aisladas a partir de *Xylopia aromatica*. *Aromin* fue aislada desde corteza de esta especie.

Londersassen *et al.* (1991) establecieron que la citotoxicidad de las ACGs estaba íntimamente relacionada con su capacidad de inhibición del enzima NADH:ubiquinona oxidorreductasa o Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial o Cadena Transportadora de Electrones (CTE).

2. LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES (CTE) MITOCONDRIAL

La mitocondria juega un papel crítico en la función celular por su implicación en la oxidación de sustratos para generar energía para la célula, siendo el principal sitio de producción de ATP. Además, también juega un papel en la regulación del gasto energético, la señalización de la apoptosis y la producción de EROs (Lanza *et al.* 2009).

En la matriz de la mitocondria se lleva a cabo el ciclo de Krebs y la β -oxidación de los ácidos grasos. El resultado final de estas rutas metabólicas es la producción de dos donadores de electrones: NADH y FADH_2 . Los electrones de estos dos donadores son pasados a través de la CTE hasta el oxígeno, el cual se reduce para formar agua. Este transporte se lleva a cabo mediante un proceso compuesto por múltiples pasos, que tienen lugar en la membrana mitocondrial interna (Figura 1).

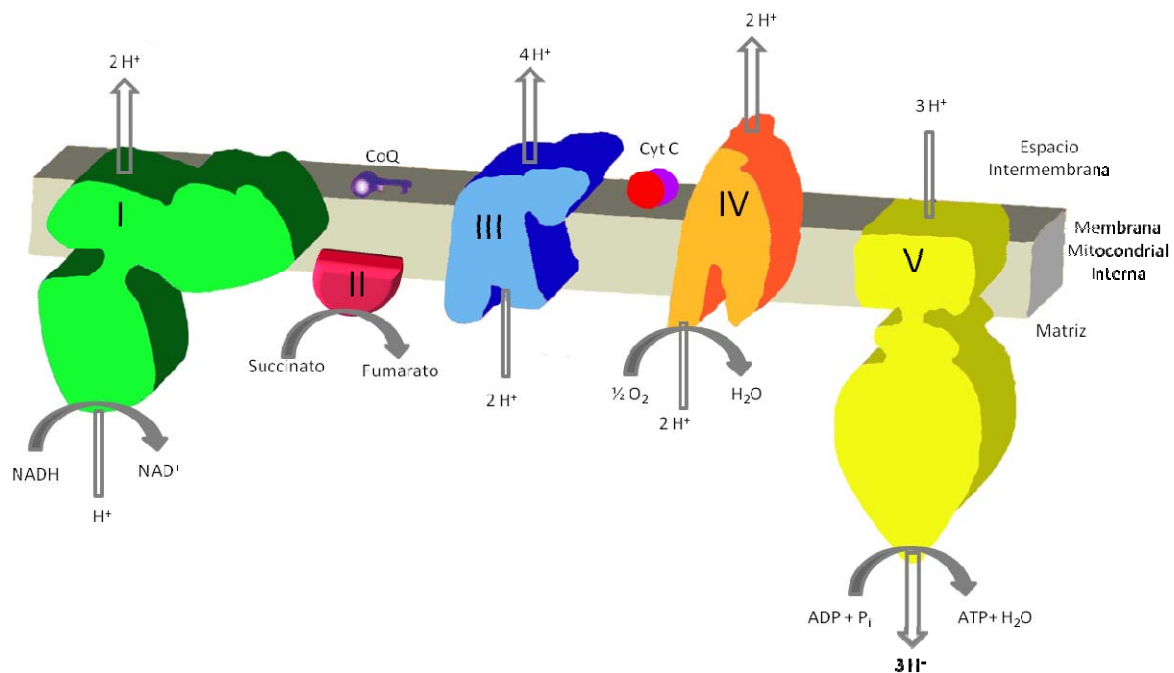


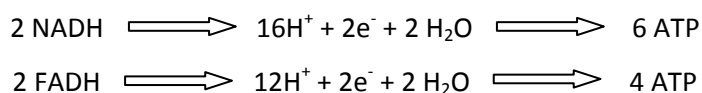
Figura 1. Esquema de la CTE mitocondrial. Se representan los cinco complejos entre los cuales se dan las reacciones de oxido-reducción que originan un gradiente de protones que aprovecha el Complejo V para la generación de ATP.

El NADH se oxida a NAD^+ mientras en el Complejo I el FMN se reduce a FMNH_2 , y posteriormente la oxidación del FMN es regenerada por transferencia de los electrones al hierro de los centros Fe-S del Complejo I. El balance final es el movimiento de 2H^+ desde la matriz al espacio intermembrana y de 2e^- que son donados a la ubiquinona (UQ) o Coenzima Q (CoQ). La reducción de la ubiquinona transfiere 2e^- a otro centro Fe-S, y de aquí a otra ubiquinona que está anclada a la membrana interna y que puede difundir lateralmente, actuando como un transportador activo de electrones a través de la membrana interna mitocondrial. Así el Complejo I acopla el movimiento de 2e^- desde el NADH y la translocación de 2H^+ desde la matriz hasta el espacio intermembrana.

El Complejo II cataliza la oxidación desde succinato a fumarato, pasando electrones desde el succinato a la coenzima FAD. Luego, estos e^- pasan a un centro Fe-S y desde allí a la ubiquinona unida a membrana. En el Complejo II, que no es transmembrana, no se da transporte de H^+ a través de la membrana. Los electrones pasan al Complejo III mediante la ubiquinona reducida (UQH_2) que difunde desde los Complejos I o II. Sus 2e^- son movidos de uno en uno a través de la vía en la que están involucrados un centro Fe-S y los citocromos c_1 , b_L y b_H , resultando en el paso de electrones de uno en uno al citocromo c, transportador soluble en agua, junto con la translocación de 4H^+ desde la matriz hasta el espacio intermembrana.

El citocromo c, que reside en el espacio intermembrana, contiene un grupo hemo, el cual solo puede transportar electrones de uno en uno desde el citocromo c_1 del Complejo III hasta el Complejo IV. El complejo IV, último complejo proteico en la CTE, es el destino final de los electrones para la reducción de oxígeno a agua, combinada con la translocación de 2H^+ desde la matriz hasta el espacio intermembrana.

El ATP es generado mediante la fosforilación oxidativa por Complejo V, la ATP Sintasa, donde el gradiente de protones generado por la cadena transportadora provoca este proceso. Como la concentración de protones en el espacio intermembrana está incrementada (disminuyendo el pH), este gradiente protónico es aliviado mediante el pase de protones a través del Complejo V a la matriz, a la vez que se sintetiza ATP en la propia matriz.



3. LAS ACGs COMO INHIBIDORES DEL COMPLEJO I DE LA CTE MITOCONDRIAL

Una de las principales controversias relacionadas con el mecanismo de funcionamiento del Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial es el número de sitios de unión que presenta tanto para el CoQ como para sus distintos inhibidores. Degli Esposti *et al.* (1994) establecieron una clasificación de estos inhibidores, basándose en la hipótesis de la existencia de tres sitios, ya que es probable que las propiedades cinéticas de cada tipo de inhibidor estén íntimamente relacionadas con los diferentes sitios de unión del CoQ: sitio no competitivo (Sitio N), sitio acompetitivo (sitio U) y sitio competitivo (sitio C).

Los inhibidores del tipo N (también llamados de tipo B o clase III) estarían representados por la *rotenona* y la mayor parte de las ACGs. Los inhibidores del sitio U (tipo A o clase I) incluyen las ACGs bis-tetrahidrofuránicas *rolliniastatin-2* y *cherimolin-1*. Finalmente, los inhibidores del sitio C (tipo C) estarían representados por el mixotiazol, siendo algunos de ellos inhibidores a su vez del Complejo III. También se han descrito ACGs que se unen a dos sitios de unión (N y U) de manera simultánea, como *rolliniastatin-1* y *rollimembrin* (Figura 2) (Tormo *et al.* 1999).

Parece que los sitios de unión de los inhibidores están situados muy próximos. La mayor parte de los inhibidores conocidos compiten por la unión a varios de estos sitios, debido a un solapamiento parcial entre ellos, pero el dominio es lo suficientemente amplio como para permitir la unión no solapante de algunos de estos inhibidores (Tormo *et al.* 2000).

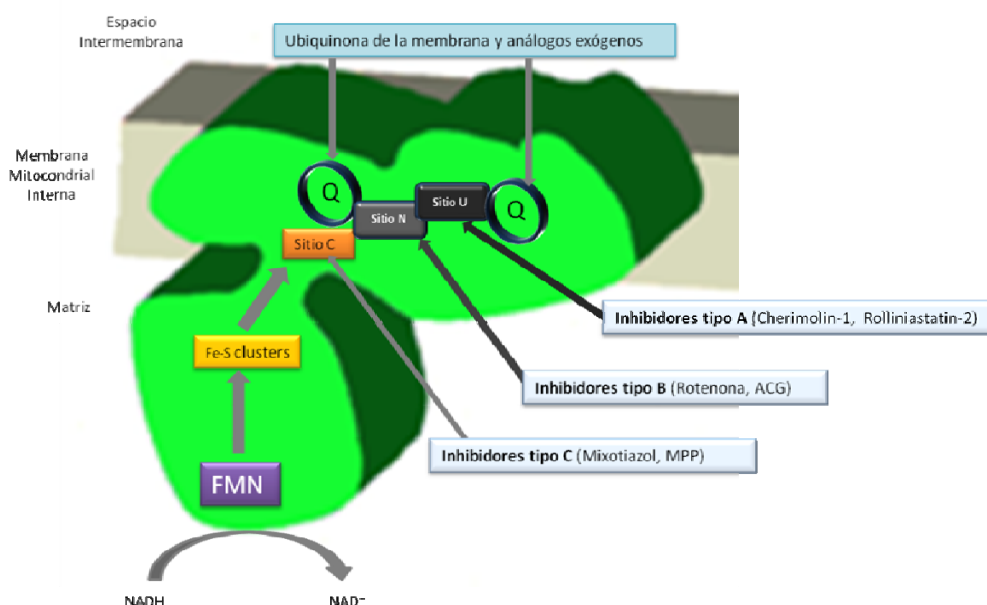


Figura 2. Clasificación de los inhibidores del Complejo I en función de sus sitios de unión: (i) Tipo A o U (*rolliniastatin-2*, *cherimolin-1*); (ii) Tipo B o N (*rotenona*, ACGs en su mayoría); (iii) Tipo C (*mixotiazol*, *MPP*).

La *rotenona* es el compuesto más frecuentemente utilizado como modelo de inhibidor del Complejo I mitocondrial. Su uso para el estudio de enfermedades neurodegenerativas está ampliamente desarrollado, lo cual ha permitido un mejor conocimiento del mecanismo de acción de este compuesto, al igual que un mayor conocimiento del Complejo I. La *rotenona* (Figura 3) es un producto natural que deriva biogénicamente de los isoflavonoides y se extrae a partir de especies de leguminosas. Se usa comúnmente como insecticida para jardines o para eliminar determinadas poblaciones de peces en lagos y estanques (Betarbet *et al.* 2000).

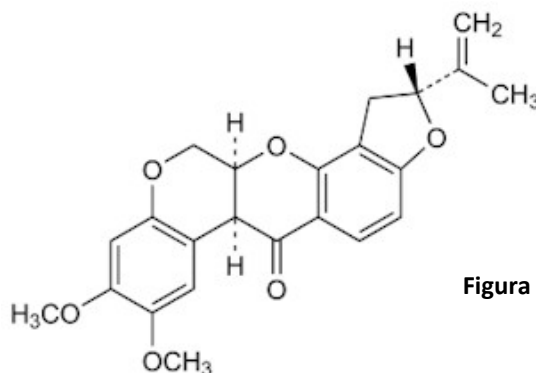


Figura 3. Estructura de la *rotenona*.

La *rotenona* es un inhibidor altamente selectivo del Complejo I de la CTE mitocondrial, y al ser un compuesto relativamente hidrofóbico puede atravesar las membranas biológicas fácilmente. Se ha descrito que la inhibición del Complejo I por la *rotenona* resulta en la apertura del Poro de Transición de Permeabilidad Mitocondrial (PPTM) (Wang *et al.* 2004) y en la masiva producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Seaton *et al.* 1997; Hensley *et al.* 1998; Panov *et al.* 2005), que atacan a las proteínas y al ADN, causándoles modificaciones específicas que permiten su detección en modelos experimentales (Greenamyre *et al.* 2003). La *rotenona* se ha utilizado para generar modelos de la enfermedad de Parkinson (Panov *et al.* 2005; Chen *et al.* 2005).

Como hemos mencionado con anterioridad, las ACGs han sido también descritas como inhibidores del Complejo I de la CTE mitocondrial. Durante muchos años se han estudiado las relaciones estructura-actividad de esta familia de productos naturales, como los más potentes inhibidores conocidos del Complejo I (Royo *et al.* 2003; Tormo *et al.* 2003; Tormo *et al.* 2005; Chahboune *et al.* 2006; Barrachina *et al.* 2007). Es necesario remarcar la importancia que han adquirido estos inhibidores del Complejo I como herramientas que han permitido el estudio del mecanismo de funcionamiento del mismo, así como de las patologías asociadas a su deficiencia.

En la presente tesis hemos estudiado las implicaciones que la inhibición del Complejo I tiene sobre la funcionalidad de la mitocondria en un primer estadio, y finalmente sobre la viabilidad celular. Hemos estudiado dos tipos de inhibidores (*rotenona* y *ACGs*), comparando sus efectos y relacionando esta inhibición con diversos parámetros y eventos propios de la cascada de apoptosis, tratando en último término de esclarecer la relación entre su actividad inhibidora del Complejo I y su potencia como agentes citotóxicos sobre líneas tumorales humanas.

4. APOPTOSIS

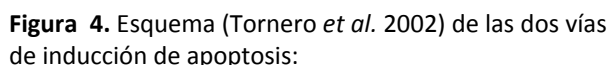
La muerte celular puede suceder mediante dos mecanismos muy diferentes, necrosis o apoptosis. La necrosis, también llamada muerte celular accidental o patológica, se desencadena cuando las células se exponen a una variación extrema de las condiciones fisiológicas (*e.g.* hipertermia, hipoxia, etc.), que puede producir daños en la membrana plasmática. Por el contrario, la apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico que ocurre bajo condiciones fisiológicas normales, de forma habitual en los organismos eucariotas pluricelulares (Tabla 1).

PARÁMETRO	NECROSIS	APOPTOSIS
morfología celular	expandida	contraída
integridad membrana plasmática	destrucción precoz	sin modificaciones iniciales
cromatina	desintegrada	condensada
ADN nuclear	daño tardío	daño precoz
fragmentación DNA	desordenada	ordenada
tejidos pericelulares	signos de inflamación	signos de fagocitosis
mitocondrias	hinchadas	sin modificaciones visibles iniciales
membrana nuclear	rota	normal
requerimiento energético	innecesario	necesario
síntesis de proteína	detenida	necesaria

Tabla 1. Diferencias entre mecanismos de muerte celular, necrosis y apoptosis (Dubin *et al.* 2000)

En la presente tesis nos hemos enfocado en el estudio de la apoptosis o muerte celular programada inducida por inhibidores del Complejo I, utilizando por un lado como modelo, la *rotenona*, cuyos efectos en esta área han sido relativamente bien caracterizados previamente, y por otro lado las *AGGs* como inhibidores más potentes de dicho complejo, pero poco estudiados en cuanto al mecanismo de acción

2. Vía intrínseca



1. Vía extrínseca a través de los receptores relacionados con FAS y el factor de necrosis tumoral (TNF), que originan la activación de la caspasa-8.
2. Vía intrínseca o mitocondrial

extracelulares, entre los que se encuentran distintas drogas citotóxicas, especies reactivas de oxígeno (EROs), anoxia, glucocorticoides, inmunoglobulinas, radiaciones ionizantes, hipertermia u otros.

- II. Fase de daño mitocondrial efectivo (fase efectora). En ella están involucradas las membranas mitocondriales y la matriz mitocondrial. Durante esta segunda fase se producen cambios significativos en la función de las membranas mitocondriales, que se traducen en un incremento de la permeabilidad de las mismas, incluyendo la apertura del PPTM. Estos efectos facilitan la salida de iones calcio de la matriz mitocondrial al citosol, el colapso del potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), el aumento en la producción de radicales libres del oxígeno y la depleción del GSH (glutatión reducido), del ATP y del ADP en la matriz mitocondrial. Como resultado de esos efectos, se produce el aumento del volumen mitocondrial que culmina en el estallido de la mitocondria. En esta fase se produce también la activación de las caspasas (del inglés *cysteine-aspartate proteases*).

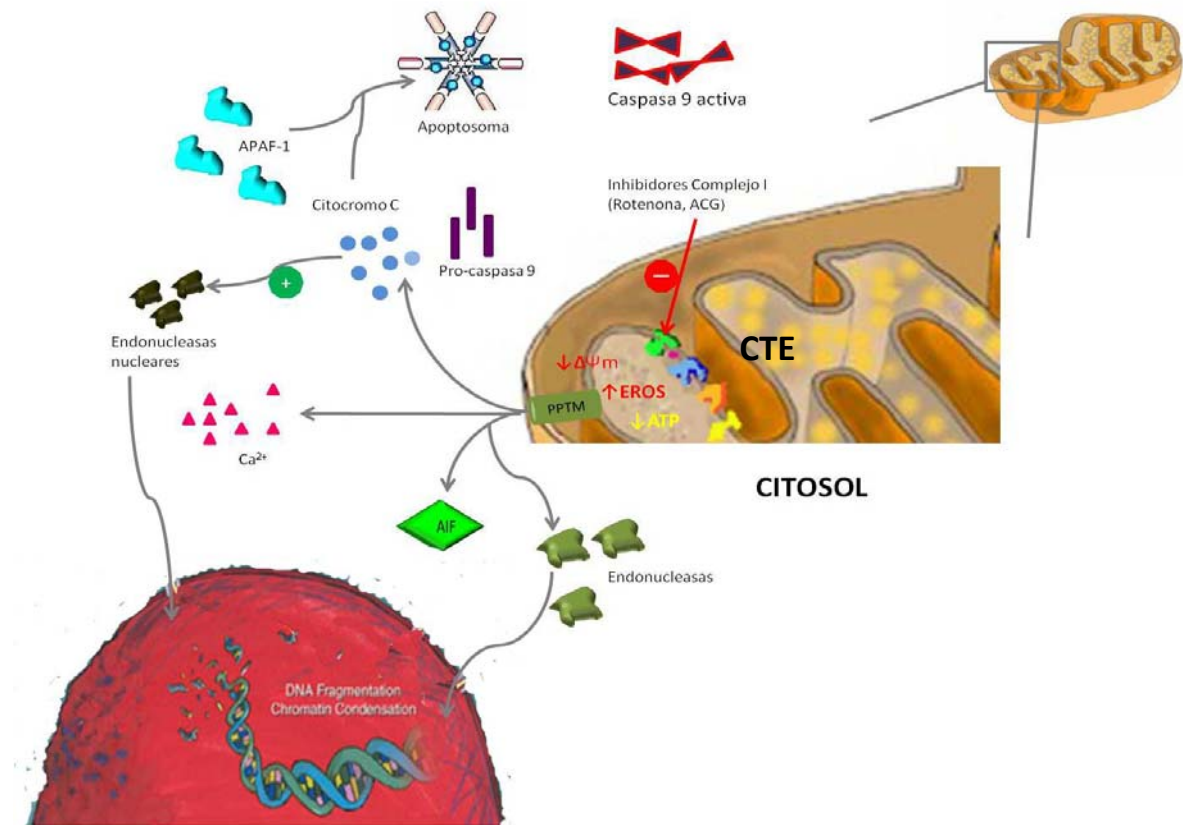


Figura 5. Procesos involucrados en la apoptosis por vía mitocondrial o intrínseca.

- III. Fase post-mitocondrial, degradativa o de lisis celular, que involucra a todas las estructuras celulares incluyendo al núcleo de la célula, y termina con la citolisis. En esta tercera fase la salida al citosol de los factores apoptogénicos mitocondriales, sumados a los generados en el mismo citosol, promueve la destrucción de las proteínas, del ADN, del ARN y de las membranas celulares, consumando así la muerte celular. Algunas proteínas liberadas tienen capacidad para activar caspasas y nucleasas citosólicas. En primer término, el citocromo c, normalmente contenido en el espacio intermembrana mitocondrial, es liberado al citosol (Desagher *et al.* 2000), donde interacciona con el adaptador Apaf-1 (*Apoptosis protease-activating factor-1*) en presencia de dATP (Zou *et al.* 1997; Cecconi *et al.* 1999), oligomeriza y recluta a la procaspasa-9, dando lugar a la formación del apoptosoma. El citocromo c activa a la Caspasa-3, que a su vez activa la endonucleasa nuclear. En segundo término, las mitocondrias apoptóticas liberan una proteína activa denominada AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*), que también activa las endonucleasas independientemente del citocromo c (Zamzami *et al.* 1996; Susin *et al.* 1999). Por último, las proteínas mitocondriales intermembrana incluyen una ADNasa específica que degrada ADN de cadena (Endonucleasa G). Durante esta última fase, aparecen las características morfológicas y bioquímicas más típicas de la apoptosis: condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, degradación masiva de proteínas esenciales, nucleolisis y finalmente citolisis (Daugas *et al.* 2000).

A continuación se describen en detalle algunos de estos parámetros, así como su participación en las diferentes etapas de la apoptosis.

4.1. APOPTOSIS Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs)

El Complejo I de la CTE es el complejo enzimático que mayor control ejerce sobre la respiración mitocondrial (Nicholls *et al.* 2000) y su inhibición hace que tenga lugar un escape masivo de electrones hacia el complejo III, que genera de tres a cinco veces más radicales libres que cuando los electrones pasan con normalidad por el Complejo I (Dyken *et al.* 1994). Esto hace que el Complejo I sea más vulnerable que el resto de los complejos de la CTE al estrés oxidativo y que, al mismo tiempo, actúe como fuente de EROs. De esta forma, inhibidores del Complejo I mitocondrial aumentan los niveles de EROs en la célula.

Las especies reactivas de oxígeno se forman continuamente en el organismo debido a la presencia de electrones desapareados. Dichos compuestos son moléculas extremadamente reactivas, de ahí su

nombre de radicales libres. Estas moléculas se estabilizan al interaccionar con componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos mediante reacciones oxidativas que son la base de su toxicidad. La aparición de estrés oxidativo puede deberse a dos causas, al aumento de la producción de radicales libres y/o al descenso de la eficiencia del sistema de defensa antioxidante endógeno.

4.2. APOPTOSIS Y POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi_m$)

La reducción del metabolismo energético está relacionada con el descenso del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (Lindahl *et al.* 1961; Pastorino *et al.* 1993), el cual también disminuye tras la inhibición de la CTE por compuestos como la *rotenona* (Zamzam *et al.* 1995).

El potencial de membrana mitocondrial se utiliza a menudo como marcador para la actividad mitocondrial. En condiciones fisiológicas la mitocondria juega un papel crucial en el mantenimiento del funcionamiento celular, centrado en las bombas de protones de la membrana interna mitocondrial (Complejo I, III y IV). Ésta genera un gradiente electroquímico matriz mitocondrial vs. espacio intermembrana, compuesto de $\Delta\psi_m$ y ΔpH , el cual es el impulsor de la síntesis del ATP (Buckman *et al.* 2001).

En situaciones de daño celular se producen grandes cambios en el transporte de iones, en comparación con las células sanas donde, normalmente, se producen sólo pequeños cambios en iones, producción y consumo de ATP, volumen y permeabilidad. Todo ello puede influir en el $\Delta\psi_m$ y dificultar la optimización del equilibrio entre las necesidades de respiración vs. La síntesis de ATP y la producción de radicales libres.

4.3. APOPTOSIS Y PORO DE PERMEABILIDAD TRANSITORIA MITOCONDRIAL (PPTM)

El PPTM es un megacanal o canal de conductancia múltiple formado por un complejo multiproteico que se forma en zonas donde las membranas interna y externa mitocondriales se juntan, comunicando la matriz mitocondrial con el citosol. El complejo del PPTM ayuda a mantener la concentración de Ca^{2+} , el pH, el $\Delta\psi_m$ y el volumen de la mitocondria, actuando a distintos niveles de conductancia y permitiendo el paso selectivo de pequeños iones. El canal abierto tiene un diámetro de 2.0-2.6 nm y permite el paso de solutos con masa molecular de hasta 1500 D (Bernardi *et al.* 2006). Los estudios realizados sobre el PPTM le involucran en los procesos de muerte celular, aunque su papel biológico en procesos no patológicos no ha sido elucidado (Crompton, 1999).

El colapso del $\Delta\Psi_m$, el desacople de la CTE y el descenso de producción de ATP se ha visto que estimulan la apertura del PPTM. La *ciclosporina A* previene la apertura del poro PPTM uniéndose a la Ciclofilina-D, una peptidil-prolil cis-trans isomerasa localizada en la membrana interna mitocondrial, que forma parte del PPTM. La unión de *ciclosporina* al poro lo mantiene en su estado cerrado, previniendo la cascada de señalización de apoptosis (Isenberg *et al.* 1999).

La permeabilización de la membrana mitocondrial es el “punto de no retorno” en la muerte celular programada. La permeabilidad de la membrana permite que diversas proteínas pro-apoptóticas contenidas en el espacio intermembrana de la mitocondria (tales como citocromo c, AIF, Smac/DIABLO, endonucleasa G y otras sean liberadas al citosol, donde ejercerán su función inductora de la muerte celular programada (Batandier *et al.* 2004).

Los principales componentes del poro implicados en la inducción de la apoptosis son:

- **Canal Aniónico Dependiente de Voltaje (CADV).** Es la proteína más abundante de la membrana externa de la mitocondria. Es responsable del transporte de metabolitos entre el citosol y el espacio intermembrana. En presencia de EROs, este canal facilita la permeabilización de la membrana mitocondrial y permite la salida al citosol de citocromo c, induciendo apoptosis. La interacción de este canal con las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bax o Bak permite la formación de poros suficientemente grandes como para liberar al citocromo c (Shimizu *et al.* 2000). Su actividad pro-apoptótica se ve contrarrestada por las proteínas anti-apoptóticas de las familias Bcl-2 o Bc-X_L (Zamzami *et al.* 1996).
- **Translocador de Nucleótidos de Adenina (TNA).** Es la proteína más abundante de la membrana interna mitocondrial. Es responsable del intercambio de ATP y ADP con el citosol. Junto con el CADV y la Ciclofilina D constituyen la principal estructura del poro de transición.
- **Receptor Periférico de Benzodiazepinas (RPB).** Su función más conocida es la síntesis de esteroides a partir de colesterol, aunque también desempeña un importante papel como regulador de los procesos oxidativos de la mitocondria, ya que está involucrado en la actividad succinato-citocromo c oxidorreductasa (Moreno-Sanchez *et al.* 1991), y es conocido como un sensor del oxígeno que media en la respuesta de adaptación de la célula. Se ha demostrado que el RPB ejerce un papel protector frente al estrés oxidativo producido por la presencia de EROs, y que su expresión aumenta en situaciones patológicas que cursan con elevada producción de

EROs. Antagonistas del RPB inducen un colapso del $\Delta\psi_m$ y un hinchamiento de la mitocondria, que llevan a la célula a la muerte por apoptosis (Fennel *et al.* 2001), mientras que los agonistas del RPB ejercen un efecto anti-apoptótico.

4.4. APOPTOSIS Y FLUJO DE CALCIO MITOCONDRIA-CITOSOL

El contenido de calcio en la mitocondria de células en estado de reposo es bajo, aunque puede llegar a acumular gran cantidad de calcio en procesos de estimulación (Szabadkai *et al.* 2007). En estas condiciones el potencial es de -150 a -180 mV (Montero, 2000), suficiente para acumular Ca^{2+} en la matriz mitocondrial en más de 5-6 órdenes de magnitud sobre la concentración de calcio citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). Los cambios en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ proporcionan señales para el control de eventos celulares tales como la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores, alteraciones en la transcripción de genes, así como la muerte celular (Giacomello *et al.* 2007). Las mitocondrias acumulan calcio cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ supera los ≈ 100 nM, en un proceso que implica al potencial de membrana $\Delta\psi_m$ (Chalmers *et al.* 2008). El calcio entra en la mitocondria a través del poro Uniportador de Calcio de la membrana interna Mitocondrial (UCM) (Montero *et al.* 2001), bajo un gradiente electroquímico mantenido a través de la membrana, sin un acople directo con la hidrólisis de ATP o el transporte de otros iones. A su vez, la mitocondria libera iones Ca^{2+} al citosol de manera más lenta vía el antiportador Na^+-H^+ . La entrada de cargas positivas de iones Ca^{2+} de manera prolongada despolariza el $\Delta\psi_m$, lo cual produce una inhibición de la producción de ATP (Leyssens *et al.* 1996). Así las señales de Ca^{2+} podrían limitar la producción de energía celular y desencadenar también el proceso de apoptosis.

4.5 APOPTOSIS Y CASPASAS

Los miembros ejecutores de la apoptosis son una serie de cisteín-proteasas dirigidas a residuos de aspartato, englobados bajo el nombre de caspasas. La familia de las caspasas se compone de 15 miembros en mamíferos, que se agrupan en dos grandes sub-familias: las caspasas relacionadas con la inflamación y las caspasas apoptóticas.

Las caspasas actúan en las mitocondrias, en el citosol y en el núcleo celular y se clasifican en los grupos siguientes: (a) mediadores de la inflamación (Caspasa-1, -4 y -5); (b) efectores de la apoptosis (Caspasa-3, -7 y -2); y (c) activadoras de Caspasas apoptogénicas (Caspasas-6, -8, -9 y -10). En la célula se sintetizan como pro-enzimas inactivas (procaspasas) que se pueden activar por autocatálisis. La actividad proteolítica depende del estado redox y del balance pro-oxidante/antioxidante presente en la

célula. Algunas caspasas son reguladas por el citocromo c o por el AIF, que pasan de las mitocondrias al citosol como consecuencia del daño mitocondrial.

Como hemos visto, la apoptosis se induce a través de diversos estímulos tanto intra- como extracelulares. En muchos casos se trata de agentes que, directa o indirectamente actúan sobre la membrana mitocondrial, afectando a su estructura y, por tanto, a su función induciendo la cascada apoptótica (Green *et al.* 1998; Loeffler *et al.* 2000). Entre estos agentes se encuentran productos naturales como las ACGs.

5. PERFIL DE SEGURIDAD CARDIACA DE CANDIDATOS A FÁRMACOS

El estudio de sustancias de origen natural constituye una de las principales vías para la obtención de nuevas moléculas con interés terapéutico. La naturaleza nos proporciona una fuente inagotable de metabolitos secundarios, muchos de los cuales han sido utilizados para el desarrollo de fármacos y de sustancias con otras aplicaciones, y a menudo han servido además como herramientas para entender el funcionamiento de diversos procesos fisiológicos. En el caso de las ACGs, además de su interés para la comprensión del funcionamiento del Complejo I, su potente actividad citotóxica los ha convertido en agentes con una potencial utilidad para el desarrollo de fármacos antitumorales. Esto nos ha hecho interesarnos igualmente por entender mejor el potencial de estos compuestos para producir ciertos tipos de efectos no deseables, como se describe en la presente sección.

Resultados previos (*e.g.* Yuan *et al.* 2003; Epavier *et al.* 2006; Marshalls *et al.* 2007; McLaughlin *et al.* 2008; Schlie-Guzmán *et al.* 2009) han sugerido que las ACGs podrían ser potenciales candidatos para el desarrollo de fármacos antitumorales. En los últimos años se ha hecho cada vez más hincapié en la predicción temprana de los efectos no deseables producidos por los posibles candidatos a fármacos (Wunberg *et al.* 2006). Dentro de estos efectos no deseables, los fenómenos de cardiotoxicidad debidos a la interacción con los canales iónicos involucrados en la función cardiaca han adquirido particular relevancia. El problema de la muerte súbita cardiaca asociada a fármacos está considerado como uno de los principales temas de seguridad en el ámbito del desarrollo de fármacos. Por ello quisimos también evaluar el potencial de las ACGs para producir algún tipo de efecto sobre dichos canales iónicos.

5.1 POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO.

Todas las células cardíacas son excitables, es decir, generan una respuesta eléctrica denominada Potencial de Acción Cardíaco (PAC) que está acoplado a una respuesta contráctil cuando son

estimuladas. El PAC es el resultado de una serie de cambios secuenciales en la conductancia de la membrana de la célula cardíaca a distintos iones. La permeabilidad de la membrana para un ion depende a su vez de su concentración a cada lado de la membrana citoplasmática, del voltaje (voltaje-dependiente) y del tiempo (tiempo-dependiente). La entrada de cargas positivas en la célula produce la despolarización, mientras que su salida facilita la repolarización cardíaca. En el PAC (Figura 6) pueden distinguirse 5 fases (0,1,2,3 Y 4) (Hoffman y Cranefield, 1962).

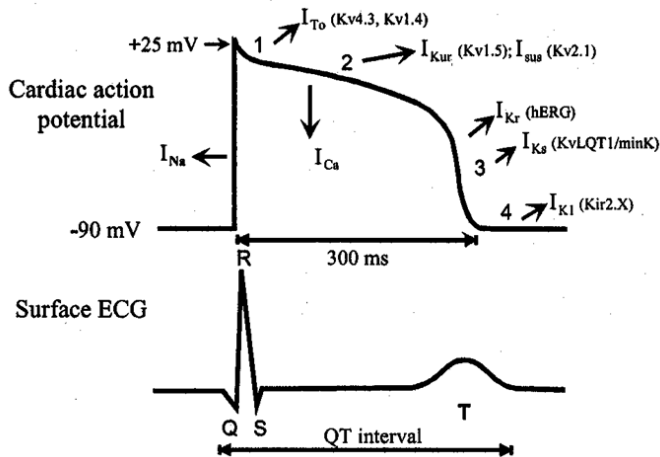


Fig. 6. Potencial de acción cardíaco. Se indican las principales corrientes de iones en cardiomiocitos, así como su relación con el intervalo QT del electrocardiograma (ECG)

El PAC se inicia con una Fase 0 de rápida despolarización, durante la cual el potencial de membrana pasa desde su valor en reposo hasta valores positivos (entre +30 y +40). Esta Fase 0 es el resultado de la activación de una corriente iónica de entrada, cuya identidad varía según el tejido cardíaco. En las células auriculares y ventriculares, así como en las del sistema His-Purkinje, que presentan un potencial de reposo comprendido entre -85 y -75 mV, la despolarización se debe a la activación de la corriente rápida de Na^+ (I_{Na}). En las células de los nodos SA (sinoauricular) y AV (auriculo-ventricular), cuyo potencial de reposo oscila entre -65 y -40 mV, se debe a la activación de la corriente lenta de Ca^{2+} (I_{CaL}).

Una vez que la despolarización alcanza su valor máximo tiene lugar la repolarización del PAC, que tarda entre 170 y 350 ms en completarse. En ella se distinguen tres fases: una fase inicial de repolarización (Fase 1), que desplaza el potencial de membrana hasta aproximadamente +10 mV como consecuencia de la inactivación de la I_{Na} , de la rápida activación de una corriente transitoria de salida de K^+ (I_{T01}) y de la activación de una corriente de Cl^- activada por el Ca^{2+} (I_{T02}).

A continuación, tiene lugar la Fase 2 o de meseta, en la que disminuye notablemente la velocidad de repolarización. Esta fase representa un equilibrio entre dos corrientes de entrada (I_{Na} y $I_{\text{Ca,L}}$) y diversas

corrientes de salida de K^+ . La activación de la $I_{Ca,L}$ permite la entrada de Ca^{2+} necesario para que se produzca el acoplamiento excitación-contracción cardíaco. La salida de K^+ se produce gracias a la activación secuencial de tres corrientes de salida de K^+ , ultrarrápida (I_{Kur}), rápida (I_{Kr}) y lenta (I_{Ks}).

Durante la Fase 3 la repolarización se acelera nuevamente y el potencial de membrana vuelve a alcanzar el valor del potencial de reposo. Esta fase es consecuencia de la inactivación de las corrientes de entrada, lo que provoca el predominio de las corrientes repolarizantes de K^+ que se habían activado durante la Fase 2 (I_{Kur} , I_{Kr} e I_{Ks}). A medida que el potencial de membrana se repolariza por completo, se produce la activación de la corriente I_{K1} , que presenta una marcada rectificación interna y que es la responsable de la parte final de la Fase 3 de la repolarización y del mantenimiento del potencial de reposo en las células cardíacas no automáticas (Fase 4).

5.2. PRINCIPALES CANALES IÓNICOS CON IMPLICACIONES EN ASPECTOS DE SEGURIDAD DE FÁRMACOS

5.2.1. Canales de Na^+

El canal de Na^+ del músculo cardíaco Nav1.5 (Figura 7) presenta tres estados conformacionales: reposo, activo e inactivo (Hodgkin *et al.* 1952; Tamargo *et al.* 1992). Durante la despolarización, el canal de Na^+ se abre, permitiendo la entrada de iones de Na^+ . A continuación, el canal se inactiva y cesa la entrada de Na^+ . Debido al importante papel que juega este canal en el PAC, se ha propuesto que anomalías en la cinética de apertura y cierre de estos canales pueden jugar un papel muy importante en la seguridad de compuestos identificados como candidatos a futuros fármacos.

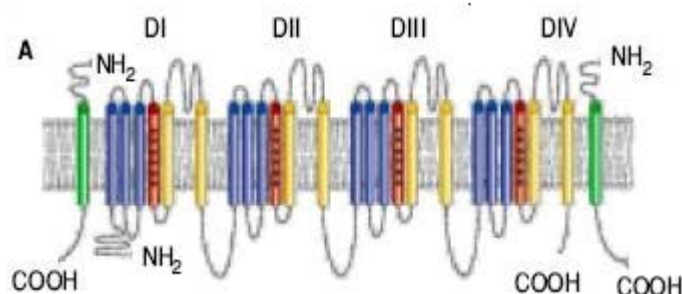
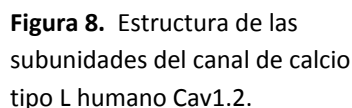


Figura 7. Estructura del canal de sodio cardíaco Nav1.5.

El gen que codifica dicho canal en cardiomiocitos se denomina *SCN5A* (George *et al.* 1995). Se ha observado que mutaciones en el gen *SCN5A* retrasan la inactivación lenta y facilitan la prolongación del intervalo QT del electrocardiograma, siendo responsables del genotipo 3 del síndrome de QT largo Romano-Ward (LQT3) (Wang *et al.* 1995; Balser, 1999). Estas mutaciones retrasan el proceso de inactivación de la I_{Na} , provocando un aumento de la entrada de Na^+ durante la repolarización del PA

Este mismo efecto se ha visto en fármacos que producen un síndrome del intervalo QT-largo adquirido a través de su interacción con este canal (Liu *et al.* 2005). Aunque la relación entre *intervalo QT* y *TdP* no es totalmente directa, la inducción de la prolongación del *intervalo QT* (como subrogado del *TdP*) se considera un aspecto indeseable en un fármaco o candidato a fármaco. Por otra parte, fármacos como los anestésicos locales, antidepresivos tricíclicos (imipramina), antiarrítmicos del grupo I (quinidina, lidocaína o flecainida), anticonvulsivantes (carbamazepina, difenilhidantoína) o la tetrodotoxina son capaces de inhibir la I_{Na} y se utilizan en clínica cotidianamente.

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se encuentran en la membrana celular y en la del retículo sarcoplásmico. En el miocardio humano se han descrito dos subtipos de canales de calcio, los L y los T (Bean *et al.* 1989). En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de los canales de calcio de tipo L, por su importancia en la función cardíaca. El flujo de Ca^{2+} a través de los canales de calcio tipo L es esencial para inducir y graduar la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS). La magnitud de la corriente del canal de calcio tipo L (Figura 8) es uno de los factores más determinantes en la fuerza del latido del corazón (contractibilidad). Así, el canal de calcio tipo L es el responsable de la iniciación del latido del corazón, de la conducción del potencial de acción a lo largo del nodo auriculoventricular, de la duración de la fase de meseta del potencial de acción (Figura 6) y de la regulación de la contractibilidad de los cardiomiocitos. Cualquier fármaco que modifique el comportamiento de estos canales podrá tener un impacto significativo en la función cardíaca.



5.2.3. Canales de K^+

Los canales de K^+ son los encargados del transporte de iones K^+ a través de la membrana citoplasmática, a favor de su gradiente electroquímico. Como se ha comentado anteriormente, y a diferencia de lo que ocurre con otros iones, existe una gran diversidad de corrientes de K^+ que presentan marcadas diferencias en sus cinéticas, dependencia de voltaje, conductancia, sensibilidad a fármacos, mediadores endógenos o toxinas. En la presente tesis nos hemos abarcado el estudio del canal de K^+ denominado hERG (Figura 9). El gen *hERG* (*human ether-à-go-go-related gene*) o *KCNH2* se expresa de forma abundante en tejido cardíaco (Sanguinetti *et al.* 1995). Mutaciones en el gen *KCNH2* están asociadas al genotipo 2 del síndrome del QT largo (LTQ2).

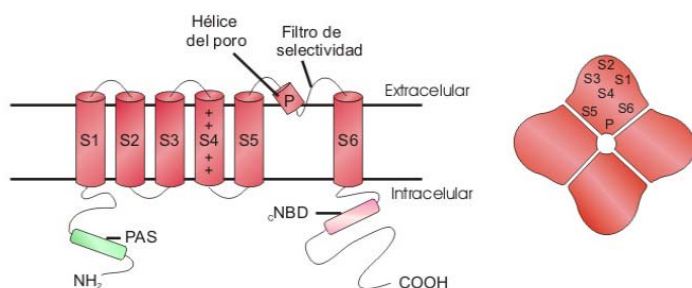


Figura 9. Estructura del canal de K^+ hERG

Los canales hERG son responsables de la corriente cardíaca I_{Kr} . Dichos canales se activan a potenciales positivos de -40mV, generando una corriente que aumenta progresivamente hasta alcanzar un máximo entre 0 y +10 mV. Esta corriente es responsable de la repolarización y de la duración del potencial de acción a frecuencias lentas, por lo que la inhibición de la I_{Kr} prolonga la duración del potencial de acción.

El canal hERG constituye la diana farmacológica de los fármacos antiarrítmicos del grupo III, pero además también es capaz de unirse a muchos otros tipos de compuestos. El bloqueo del canal hERG produce un retardo en la repolarización que se traduce en una prolongación del intervalo QT del electrocardiograma (Figura 6). Este tipo de efecto ha sido la causa de la retirada de diversos fármacos del mercado, tales como la *terfenadina* y *astemizol*, y del fracaso de numerosos candidatos a fármacos en ensayos clínicos y preclínicos (Finlayson *et al.* 2004). En la actualidad, las agencias regulatorias exigen la realización de estudios *in vitro* e *in vivo* que determinen la capacidad de los fármacos que se presentan a registro para interactuar con este canal (*International Conference Harmonization Guideline ICH S7B: The Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation)*).

El **objetivo principal** del presente trabajo de investigación es profundizar en la caracterización del mecanismo citotóxico sobre líneas celulares tumorales de las ACGs de *Annonaceas*, utilizando como modelo la *rotenona*, un inhibidor clásico del Complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial no relacionado estructuralmente.

Se pretendió igualmente establecer si dicho mecanismo de acción es común a todas las ACGs estudiadas o si hay diferencias entre ellas que se puedan relacionar con su distinto comportamiento como inhibidores del Complejo I, tanto en lo que se refiere a su potencia como a su forma de interaccionar con el mismo.

Para ello se propuso estudiar diversos parámetros y eventos celulares relacionados con la apoptosis, utilizando un panel de compuestos representativos de la familia de las ACGs. Se plantearon, por tanto, los siguientes sub-objetivos:

- Determinación de especies reactivas de oxígeno y radicales superóxidos.
- Evaluación de los niveles de ATP celular.
- Determinación del efecto de de las ACGs sobre el potencial de membrana mitocondrial.
- Estudio de la posible apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial tras el daño mitocondrial originado por las ACGs.
- Determinación del flujo de calcio mitocondrial al citosol.
- Comprobación de la activación de la ruta de las Caspasas.
- Evaluación de los posibles daños en el núcleo originados en el tratamiento con ACGs.
- Determinación de la variación en la permeabilidad de la membrana plasmática.

Como **objetivo secundario** y en relación con el potencial de estos compuestos para convertirse en candidatos para el desarrollo de fármacos antitumorales con utilidad clínica, se propuso la evaluación de los riesgos potenciales de seguridad que pueden presentar estos compuestos a nivel cardiaco.

Para ello se planteó el estudio del efecto de estos compuestos sobre tres tipos de canales iónicos implicados en seguridad cardiovascular, evaluando su posible interacción con:

- El canal de potasio hERG
- El canal de sodio Nav1.5
- El canal de calcio de tipo L Cav1.2

1. LÍNEAS CELULARES

Todas las líneas celulares de los ensayos correspondientes a citotoxicidad y apoptosis fueron adquiridas a ATCC. Las líneas celulares usadas en los ensayos de seguridad de fármacos fueron cedidas por Merck Research Laboratories (Rahway, West Point), a excepción de la línea celular usada en el ensayo funcional de potasio hERG que fue adquirida a B'SYS. Los medios, sueros y suplementos se compraron a Invitrogen, excepto cuando se indica otro proveedor. Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, excepto las líneas HEK293 (*human embryony kidney*) que expresan los canales iónicos Nav1.5 o Cav1.2, y que fueron incubadas a 10% CO₂. Cada línea celular se mantuvo en un medio específico acorde a sus mejores condiciones de crecimiento:

- Línea celular A549 (carcinoma de pulmón, ATCC CCL-185). Las células fueron mantenidas en medio F-12 de Ham, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml.
- Línea celular HepG2 (carcinoma hepatocelular, ATCC HB 8065). Las células fueron mantenidas en medio esencial mínimo (MEM), suplementado con 10% de FBS, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM y aminoácidos no esenciales 100 µM.
- Líneas celulares HT29 (adenocarcinoma colorectal, ATCC HTB-38), MES-SA (sarcoma uterino ATCC CRL-1976) y MES-SA/Dx5 (sarcoma uterino resistente a múltiples fármacos, ATCC CRL-1977). Las células fueron mantenidas en medio McCoy's 5A, suplementado con 10% de FBS y L-glutamina 2 mM.
- Línea celular MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria, ATCC HTB-22). Las células fueron mantenidas en MEM, suplementado con 10% de FBS, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 100 µM e insulina 0.01 mg/ml.
- Línea celular 184A1 (glándula mamaria de tejido normal transformadas químicamente, ATCC CRL 8798). Las células fueron mantenidas en medio MEM (Mammary Epithelium Basal Medium, Lonza/Clonetics) suplementado con MEGM (Mammary Epithelium Growth Medium, Lonza) y 5 µg/ml de transferrina.
- Línea celular CCD 16Lu (fibroblastos de pulmón normal, ATCC CCL 204). Las células fueron mantenidas en MEM Eagle (ATCC) suplementado con 10% de FBS.
- Línea celular HEK293 expresando de manera estable el canal de calcio tipo L Cav1.2 (subunidades $\alpha 1c$, $\alpha 2\delta$ y $\beta 2a$) y el canal rectificador Kir 2.3 (Cl-6-37-3). Las células fueron mantenidas en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), suplementado con 10%

FBS, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. La selección de las células que expresan el canal se llevó a cabo adicionando al medio 40 µg/ml de zeocin™, 100 µg/ml de geneticina G418 y 100 µg/ml de higromicina, antibióticos frente a los que eran resistentes sólo las células que tenían el plásmido transfectado.

- Línea celular HEK293 expresando de manera estable el canal de sodio Nav1.5. Las células fueron mantenidas en MEM *with Earle's Salts* con GLUTA MAX I, suplementado con 10% FBS.
- Línea celular HEK293 expresando de manera estable el canal de potasio hERG. Las células fueron mantenidas en DMEM/F12 suplementado con FBS, 100U/ml de penicilina/estreptomycin y 100 µg/ml de neomicina.

Se realizaron curvas de concentración para cada una de las líneas celulares con el fin de conocer la concentración óptima de ensayo para cada una de ellas. Finalmente, las células fueron sembradas en placas tratadas para cultivo celular de 96 pocillos a cada concentración óptima: A549 (100.000 células/ml); HepG2, HT29 y MCF-7 (150.000 células/ml); MES-SA, MES-SA/Dx5, 184A1 y CCD 16Lu (200.000 células/ml); HEK293_Cav1.2 (700.000 células/ml); HEK293_Nav1.5 (500.000 células/ml) y HEK293_hERG (600.000 células/ml).

2. PREPARACIÓN DE COMPUESTOS

2.1. PREPARACIÓN DE COMPUESTOS PARA EL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD MTT

Todos los controles y estándares fueron adquiridos a Sigma Aldrich; las ACGs fueron suministradas por el profesor Diego Cortes de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia. Todos los compuestos fueron disueltos en 100% DMSO. Las ACGs se prepararon a una concentración de 40 mM, a excepción de la *guanaconetina-1*, que se disolvió a 22.2 mM, y la *annonacin-A*, a 22.9 mM. La *rotenona* y los controles positivos (*actinomicina D* y *metilmetanosulfonato* (MMS)), fueron disueltos a una concentración de 20 mM, la *doxorubicina* a 40 mM. Todas las disoluciones fueron preparadas justo antes del ensayo, con el fin de evitar posibles problemas de precipitación. A continuación se prepararon diluciones seriadas 1:2 (10 puntos) en 100% DMSO de las ACGs, la *rotenona*, y los controles y estándares, que fueron dispuestos en placas de 96 pocillos y tratados de la misma manera a lo largo de todo proceso.

2.2. PREPARACIÓN DE COMPUESTOS PARA EL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD LDH Y LOS ENSAYOS DE APOPTOSIS

Las ACGs y la *rotenona* fueron preparadas en DMSO/etanol absoluto en proporción 60% DMSO y 40% etanol. Las concentraciones a las que fueron preparadas fueron: *laherradurin* (20 mM), *rolliniastatin-1* (10 mM), *cherimolin* (5 mM), *motrilin* (10 mM) y *rotenona* (5 mM). A continuación se realizaron curvas con 6 puntos de dilución a 1:2 en DMSO/etanol.

El control *vinblastina* (Sigma Aldrich), utilizado para el ensayo de Caspasa-9, fue disuelto en DMSO/etanol a una concentración de 10 mM. La *ciclosporina A* (Sigma Aldrich), utilizada para el test de LDH en el ensayo de la implicación del PPTM fue preparada en DMSO/etanol a 2 mM.

Las ACG, controles y estándares fueron dispuestos en una placa de 96 pocillos y fueron tratados de la misma manera a lo largo de todo el proceso.

2.3. PREPARACIÓN DE COMPUESTOS PARA LOS ENSAYOS DE CARDIOTOXICIDAD

Las ACG y la *rotenona* fueron preparadas en 60% DMSO y 40% etanol, a una concentración de 10 mM. A continuación se realizaron curvas de 6 puntos, mediante diluciones seriadas a 1:2 en DMSO/etanol.

Todos los controles y estándares fueron comprados a Sigma Aldrich. Los estándares para los distintos ensayos se prepararon también en DMSO/etanol, a las concentraciones que se indican a continuación:

Para el ensayo de hERG: 2 mM *astemizol*, 10 mM *amiodarona*, 10 mM *bepiridilo*, 10 mM *haloperidol*, 10 mM *imipramina* y 10 mM *terfenadina*.

Para el ensayo de Nav1.5: 2 mM *tetrodotoxina* (TTX), 10 mM *riluzol* y 10 mM *tetracaína*.

Para el ensayo de Cav1.2: 5mM *felodipina*, 5 mM *diltiazem*, 250 μ M *isradipina*, 5 mM *nicardipina*, 5 mM *nifedipina*, 5 mM *nimodipina*, 5 mM *nitrendipina*, 5 mM *metoxiverapamilo*, 5 mM *verapamilo*. Todos los compuestos fueron dispuestos en una placa de 96 pocillos y tratados de la misma manera a lo largo de todo el proceso.

3. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

Para el estudio de citotoxicidad se utilizaron dos ensayos:

- A. Ensayo colorimétrico de reducción de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, MTT (Sigma-Aldrich), realizada por el enzima mitocondrial Succinato-deshidrogenasa, resultando en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar de esta manera la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas (Corine *et al.* 1998; Liu *et al.* 2010). La cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas.
- B. Ensayo colorimétrico de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). El ensayo permite la medición de la actividad del enzima LDH utilizando un *cocktail* de reactivos que contiene lactato, NAD^+ , diafrosa y la sal de tetrazolio INT (Isenberg *et al.* 1999). La LDH cataliza la reducción de NAD^+ a NADH en presencia de L-lactato, y la formación de NADH se puede medir mediante una reacción acoplada, en la que la sal de tetrazolio INT se reduce hasta un producto de formazán rojo, que se puede medir por espectrofotometría. El incremento en la actividad LDH en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas.

3.1. DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD MEDIANTE EL ENSAYO DE MTT

Las células se sembraron a sus correspondientes concentraciones en placas de 96 pocillos y se dejaron incubando durante 24 horas. A continuación se añadieron los compuestos, preparados según el apartado 2.1, en una dilución 1:80 (5 μl de compuesto/400 μl de medio), utilizando un dispensador automático de placas multipocillo BiomekFX™ (Beckman Coulter). De esta mezcla, 100 μl fueron pipeteados a 3 placas de células, resultando cada compuesto ensayado por triplicado, en curvas de 10 puntos (diluciones 1:2) a una concentración máxima de 500 μM , y con un porcentaje de DMSO constante de 1.25%. Previamente se realizó una curva de DMSO para cada línea celular, observándose que concentraciones por debajo de 2% de DMSO no tenían ningún efecto significativo en ninguna de las líneas empleadas.

Como control positivo utilizamos *MMS* (1 mM) y como control negativo DMSO a la misma concentración a la que habían sido disueltos los compuestos y los controles. Como estándares se utilizaron curvas de *doxorubicina* (concentración máxima 500 μM), *actinomicina D*, *MMS* y *rotenona* (concentraciones máximas 250 μM), preparados en las condiciones descritas en el apartado 2.1.

La *doxorubicina* es un antibiótico de la familia de las antraciclinas ampliamente utilizado en quimioterapia, que ejerce sus efectos citotóxicos por medio de dos mecanismos diferentes, bloqueando la síntesis del ADN y su transcripción, e inhibiendo la topoisomerasa II. La *actinomicina D* es un antibiótico polipeptídico, también usado en tratamientos de quimioterapia por su actividad citotóxica, que se une al ADN en el complejo de iniciación de la transcripción, evitando así la elongación por la ARN polimerasa. El *MMS* es un agente mutagénico, que reacciona directamente con el ADN.

Los compuestos se incubaron con las células durante 24 horas. Después de dicho tiempo se añadió el MTT a una concentración final 0.5 mg/ml y se dejó incubando con las células 3 horas. A continuación se determinó la concentración de formazán generado por espectrofotometría a 570 nm en un lector de placas multipocillo Victor2™ (PerkinElmer).

Los datos fueron analizados utilizando el programa de cálculo ADA™ (desarrollado por Merck Research Laboratories) para el cálculo de sus DE₅₀ (dosis efectiva que causa el 50% de muerte celular), tomando como 100% de muerte celular (control positivo) el tratamiento con *MMS* 1 mM, y como 0% de muerte celular (control negativo) el 1.25% de DMSO. El porcentaje de muerte celular para cada concentración se calculó aplicando la fórmula:

$$\% \text{ Muerte celular} = \frac{\text{Control negativo} - \text{Compuesto}}{\text{Control negativo} - \text{Control positivo}} \times 100$$

A continuación y utilizando el algoritmo de *Levenberg-Marquardt* para ajustar la curva de dosis-respuesta, se calculó la DE₅₀ de cada compuesto, interpolando en la curva obtenida,

3.2. DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD MEDIANTE EL ENSAYO DE LDH

La citotoxicidad de las cuatro ACG seleccionadas para estudios detallados (*laherradurin*, *rolliniastatin-1*, *cherimolin* y *motrilin*) fue analizada mediante el ensayo de LDH (Clontech), analizando su efecto sobre la línea celular HepG2 a diferentes tiempos (15', 30', 1h, 2h, 4h, 6h, 12h, 24h y 48h). Este ensayo se realizó tomando como referencia la *rotenona*. Como control negativo se añadió en el pocillo la misma concentración de DMSO/etanol que se utilizó para disolver las ACGs y la *rotenona*, y como control positivo *Tritón X-100* al 1%.

Las células HepG2 se distribuyeron a 150.000 células/ml en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas se cambió el medio y se añadió 100 µl de medio MEM sin rojo fenol suplementado con 5% de suero. A

continuación se añadieron los compuestos preparados según el apartado 2.2, realizando una dilución 1:100 (4 µl de compuesto/400 µl de medio) utilizando una estación BiomekFX™. De esta mezcla, 100 µl fueron pipeteados a tres placas de células que contenían 100 µl de medio, siendo cada compuesto ensayado por triplicado en curvas de 6 puntos (diluciones 1:2), con concentraciones máximas de 50 µM (*rolliniastatin-1*, *motrilin*), 25 µM (*cherimolin*, *rotenona*) y 100 µM (*laherradurin*), siendo el control negativo 0.3% DMSO / 0.2% etanol. Siguiendo los tiempos de tratamiento, 100 µl de sobrenadante fueron aspirados de cada pocillo y pipeteados en otra placa mediante un BiomekFX™. A continuación se realizó el ensayo de actividad LDH en el sobrenadante siguiendo el protocolo descrito previamente (Ruch, 1989). Las placas fueron leídas por espectrofotometría a 490 nm en un lector de placas multipocillo Victor2™.

Los datos fueron analizados mediante el programa Screener™ (Genedata) para el cálculo de la DE₅₀ (dosis efectiva al 50%) según lo descrito en el apartado 3.1, utilizando como 100% de liberación de LDH los pocillos tratados con 1% de *Tritón X-100* (control positivo) y como 0% de muerte celular los pocillos tratados con DMSO/etanol (control negativo). A todos los pocillos se le restó en primer lugar el fondo asociado al medio de cultivo.

4. ESTUDIOS DE APOPTOSIS

4.1. MEDICIÓN DE ATP

Para la determinación de la disminución de los niveles de ATP en células apoptóticas se utilizó el kit de Promega *CellTiter Luminiscent Cell Viability Assay*™ (Zhang *et al.* 1999; Niles *et al.* 2007), donde la cantidad de luminiscencia obtenida es proporcional a la cantidad de ATP en el pocillo. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor, optimizando el protocolo para células HepG2.

Las células HepG2 fueron distribuidas a 150.000 células/ml en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas se retiró el medio y se añadieron los compuestos (preparados según el apartado 2.2) en una dilución 1:200 (2 µl de compuesto/400 µl de medio) mediante una estación BiomekFX™. De esta mezcla, 100 µl fueron pipeteados a tres placas de células que contenían 100 µl de medio, siendo cada compuesto ensayado por triplicado en curvas de 6 puntos (diluciones 1:2), con concentraciones máximas de 50 µM (*rolliniastatin-1*, *motrilin*), 25 µM (*cherimolin*, *rotenona*) y 100 µM (*laherradurin*), siendo el control negativo 0.3% DMSO / 0.2% etanol.

El ensayo se realizó siguiendo los tiempos de tratamiento 1h, 3h, 6h, 12h, 24h y 48h. Las placas fueron leídas en un multilector Victor2™. Para la determinación de la concentración de ATP a partir de los datos de luminiscencia se realizó una curva de ATP (de 10^{-10} a 10^{-12} moles) y los valores obtenidos para cada condición fueron extrapolados en dicha curva (Figura 1). De esta manera se calculó la concentración de ATP en cada pocillo tratado con las ACGs, la *rotenona* y el control negativo DMSO/etanol.

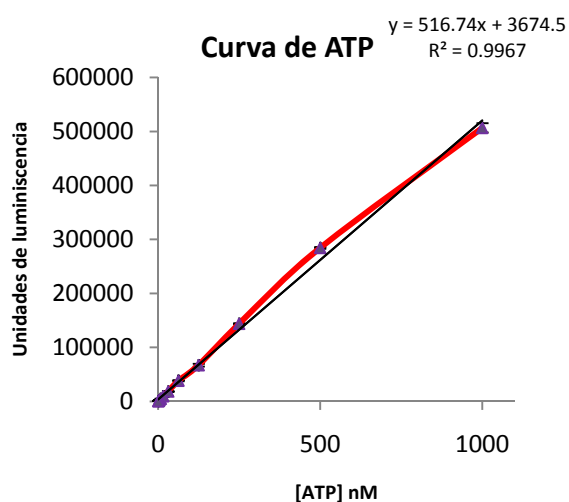


Figura 1. Curva de calibración de ATP obtenida a partir de 12 puntos ensayados por triplicado, usando el kit *CellTiter Luminiscent Cell Viability Assay™*.

4.2. MEDICIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROS) Y SUPERÓXIDOS

4.2.1. *Medición de especies reactivas de oxígeno (EROs)*

La generación de EROs fue detectada con la sonda fluorescente *C-DCDHF-DA* (diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetoximetilo) (Sigma) (Satoh *et al.* 1996; Panaretakis *et al.* 2001). El *C-DCDHF-DA* fue disuelto en DMSO para obtener un stock a 10 mM. El *C-DCDHF-DA* pasa a través de la membrana plasmática sin dificultad, y una vez dentro de la célula sus grupos lipofílicos bloqueados son liberados por esterasas no específicas, pudiendo de esta forma unirse a EROs y emitir fluorescencia.

Las células HepG2 fueron distribuidas a 150.000 células/ml en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas se cambió el medio y se añadió 100 μ l de medio MEM sin rojo fenol suplementado con 5% de suero. A continuación se añadieron los compuestos preparados según el apartado 2.2., realizando una dilución 1:100 (4 μ l de compuesto/400 μ l de medio) utilizando una estación BiomekFX™, estando los compuestos ensayados a las concentraciones descritas en el apartado 4.1. Siguiendo los tiempos de

tratamiento con los compuestos (1h, 3h, 6h, 12h, 24h y 48h), el medio fue retirado de las placas, que fueron lavadas con tampón de ensayo (NaCl 165 mM, KCl 4.5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 10 mM y glucosa 10 mM, pH 7.4). A continuación las células fueron incubadas con 10 μ M de *C-DCDHF-DA* en medio durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente las placas fueron lavadas dos veces con tampón de ensayo antes de ser leídas en una unidad FLIPR^{TETRA} (Molecular Devices) a una longitud de onda de excitación de 495 nm y de emisión de 520 nm. Además, se hicieron fotografías utilizando un microscopio invertido de fluorescencia Axiovert200TM (CarlZeiss).

Se calculó el ratio de producción de EROs de cada concentración de *ACG* con respecto al nivel basal del control negativo de DMSO/etanol, dividiendo cada dato por el valor obtenido con el solvente.

4.2.2. Medición de radicales superóxidos

La generación de superóxidos fue detectada con la sonda fluorescente dihidroetidio (*DHE*) (Tebu-bio). El *DHE* fue disuelto en DMSO para obtener un stock a 10 mM. El *DHE* es oxidado por superóxidos a un producto que se une al DNA, emitiendo fluorescencia (Radad *et al.* 2006).

Las células HepG2 fueron distribuidas a 150.000 células/ml en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas de incubación se añadieron los compuestos siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Siguiendo los tiempos de tratamiento con los compuestos (1h, 3h, 6h, 12h, 24h y 48h), el medio fue retirado de las placas que fueron lavadas con tampón de ensayo (NaCl 165 mM, KCl 4.5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1mM, Hepes 10 mM y glucosa 10 mM, pH 7.4), a continuación las células fueron incubadas con 10 μ M *DHE* en medio durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente las placas fueron lavadas dos veces con medio de ensayo antes de ser leídas en una unidad de FLIPR^{TETRA}, a una longitud de onda de excitación de 515 nm y de emisión de 595 nm. A continuación se hicieron fotografías usando un microscopio invertido de fluorescencia Axiovert200TM (CarlZeiss).

Se calculó el ratio de producción de superóxidos de cada concentración de *ACG* con respecto al nivel basal del control negativo de DMSO/etanol.

4.3. MEDICIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi_m$)

Para determinar los cambios en el potencial de membrana mitocondrial utilizamos la sonda fluorescente *JC-1* (ioduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil benzamidazolocarbocianina) (Tebu-bio). A altos valores de $\Delta\psi_m$ el *JC-1* se acumula en la mitocondria en forma de agregados que exhiben una

fluorescencia roja. Por el contrario, a bajos $\Delta\psi_m$, una menor cantidad de fluorocromo entra en la mitocondria y la mayor parte se queda en el citosol en forma de monómeros que presentan una fluorescencia verde. El ratio entre la fluorescencia roja (agregados) y fluorescencia verde (monómeros) permite estimar los cambios en $\Delta\psi_m$ (White *et al.* 1996).

El *JC-1* fue disuelto en 100% DMSO a una concentración de 10 mM. Las células HepG2 fueron distribuidas a 150.000 células/ml en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas de incubación se añadieron los compuestos preparados según el protocolo descrito en el apartado 4.2. Siguiendo los tiempos de tratamiento con los compuestos (1h, 3h, 6h, 12h, 24h y 48h), el medio fue retirado de las placas, que fueron lavadas con tampón de ensayo (NaCl 165 mM, KCl 4.5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 10 mM y glucosa 10 mM, pH 7.4). A continuación las células fueron incubadas con fluorocromo *JC-1* a 2 μ M disuelto en tampón de ensayo durante 30 minutos a 37°C y las placas se leyeron en un FLIPR^{TETRA} utilizando los filtros de excitación/emisión rojo (510-545 nm / 565-625 nm) y verde (470 nm / 510-575 nm). Estas mismas placas fueron utilizadas para adquirir fotografías en un microscopio invertido de fluorescencia Axiovert200TM.

Los datos obtenidos por el FLIPR^{TETRA} (canales rojo y verde), fueron utilizados para el cálculo del cociente rojo/verde. Los valores obtenidos fueron presentados como porcentajes con respecto al control negativo DMSO/etanol, considerado como el 100 % (células con el potencial de membrana intacto).

4.4. MEDICIÓN DE CALCIO MITOCONDRIAL Y CITOSÓLICO

Para la determinación del flujo de calcio durante el proceso de apoptosis, se utilizaron dos sondas fluorescentes, *Rhod-2-AM* (Exc 549 / Em 578) y *Fluo-4-AM* (Exc 488 / Em 540), con el fin de determinar simultáneamente los niveles de calcio citosólico y calcio mitocondrial.

La sonda *Rhod-2-AM* (Tebu-bio) es permeable a la membrana y está cargada positivamente, lo que hace que se acumule selectivamente en la matriz mitocondrial debido a la carga altamente negativa de este orgánulo. Una vez dentro de la matriz mitocondrial, las esterasas cortan el enlace éster que une el grupo acetoximetilo (AM), liberando el *Rhod-2*, que es impermeable a la membrana, y que al unirse a iones Ca²⁺ emite fluorescencia (Babcock *et al.* 1997). El *Fluo-4-AM* (Molecular Probes) sólo puede unir calcio cuando se encuentra en el interior de la célula, ya que son necesarias las esterasas de la propia célula para escindir el grupo AM (Martin *et al.* 2004). El *Fluo-4-AM* es un indicador de la concentración de calcio citosólico, ya que emite fluorescencia solo cuando está unido a calcio, en el interior de la célula.

Las células HepG2 fueron distribuidas a 150.000 células/ml en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas de incubación se añadieron los compuestos, preparados según el protocolo descrito en el apartado 4.2, siguiendo los tiempos establecidos de tratamiento con los compuestos. Tras la incubación el medio fue retirado de las placas, que fueron lavadas con tampón de ensayo (NaCl 165 mM, KCl 4.5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 10 mM y dextrosa 2 g/l, pH 7.2). A continuación las células fueron incubadas con 100 µl de 10 µM *Rhod-2-AM* diluido en tampón de ensayo a temperatura ambiente durante 30 minutos para evitar que las esterasas del citoplasma actúen antes de que la sonda entre en la mitocondria. Posteriormente las placas se lavaron dos veces con tampón de ensayo y el *Fluo-4-AM* fue añadido a los pocillos, en tampón de ensayo, a una concentración de 4 µM y las placas fueron incubadas 30 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación las placas se lavaron dos veces con tampón de ensayo, leyéndose simultáneamente en un FLIPR^{TETRA} las dos sondas fluorescentes *Rhod-2-AM* (excitación 549 nm / emisión 578 nm) y *Fluo-4-AM* (excitación 488 nm / emisión 540 nm). Las placas fueron registradas posteriormente mediante fotografías en un microscopio invertido de fluorescencia Axiovert200TM.

Los datos obtenidos por el FLIPR^{TETRA} (canales rojo y verde), fueron utilizados para el cálculo del cociente calcio mitocondrial (rojo) / calcio citosólico (verde). Los valores obtenidos fueron presentados como ratios con respecto al control negativo DMSO/etanol, considerado como el valor basal de células no apoptóticas.

4.5. DETERMINACIÓN DEL PAPEL DE PORO DE PERMEABILIDAD TRANSITORIA MITOCONDRIAL (PPTM)

Para la determinación de la implicación del PPTM en la apoptosis inducida por la *rotenona* y por las ACGs, utilizamos un inhibidor del PPTM, la *ciclosporina A* (Sigma Aldrich) (Malomi *et al.* 1998).

Las placas con las células HepG2 fueron pre-tratadas durante 1 hora con 10 µM de *ciclosporina A* para bloquear la apertura del PPTM. A continuación, el medio fue cambiado y remplazado por MEM sin rojo fenol y 5% de FBS, con 10 µM de *ciclosporina A* y los compuestos a ensayar. La citotoxicidad de los compuestos fue analizada a distintos tiempos mediante el ensayo de LDH, realizado como se describe en el apartado 3.2. El ensayo se realizó en paralelo con muestras no pre-tratadas con *ciclosporina A*.

4.6. MEDICIÓN DE ACTIVIDAD CASPASA-9

El aumento en la actividad Caspasa-9 en procesos apoptóticos fue determinado usando el kit de Promega *Caspase-Glo Assay*TM (Earnshaw *et al.* 1999; Budihardjo *et al.* 1999; Stennicke *et al.* 1999). La

intensidad de luminiscencia obtenida es proporcional a la cantidad de Caspasa-9. Para dicho estudio se realizó el ensayo siguiendo el protocolo suministrado por el proveedor, optimizado para células HepG2.

Las células fueron distribuidas a 150.000 células/ml en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas se añadieron los compuestos preparados según el apartado 2.2, que fueron dispuestos en las placas de ensayo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.1. Transcurridos los tiempos de tratamiento con los compuestos, se procesaron las placas leyendo la luminiscencia en un Victor2™. Los valores obtenidos de luminiscencia fueron representados frente a la concentración de compuesto.

4.7. MEDICIÓN DEL GRADO DE CONDENSACIÓN DE CROMATINA, PERMEABILIDAD DE MEMBRANA Y MUERTE CELULAR MEDIANTE SONDAS FLUORESCENTES

La utilización de tres sondas fluorescentes con distintas propiedades de permeabilidad, que emiten fluorescencia a distinta longitud de onda al unirse al DNA como agentes intercalantes, permite estudiar aspectos relacionados con la apoptosis y muerte celular a nivel nuclear.

La sonda *Hoechst 33342* emite fluorescencia en la banda azul del espectro del visible y puede penetrar tanto en células viables como apoptóticas, pero en células apoptóticas se fija de forma preferente, ya que la condensación de la cromatina facilita su intercalación (Ciancio *et al.* 1988, Green *et al.* 1992; Abraham *et al.* 2008). La sonda *YO-PRO-1*, que emite en el canal verde, en cambio, permite la visualización sólo de células apoptóticas (Idziovrek *et al.* 1995; Plantin-Carrenard *et al.* 2003). A diferencia del *Hoechst 33342*, *YO-PRO-1* es solo permeable en células que han comenzado el proceso de apoptosis, al aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática. De esta forma, ante ambos tratamientos, las células apoptóticas mostrarán ambos tipos de fluorescencia, verde y azul, mientras que las células vivas no apoptóticas mostrarán sólo una débil fluorescencia azul de *Hoeschst 33342*. Por otra parte, el *ioduro de propidio (PI)*, que emite fluorescencia en la banda del rojo, no puede entrar en células viables ni apoptóticas, por lo que el uso de esta sonda nos permitirá ver las células ya muertas o necróticas que han perdido la integridad de la membrana (Suzuki *et al.* 1997; Moore *et al.* 1998; Lecoeur *et al.* 2002; Katori *et al.* 2007).

Para dichos ensayos utilizamos células HepG2 y los compuestos ensayados (*ACGs* y *rotenona*) en las condiciones descritas en el apartado 3.2. Los ensayos se llevaron a cabo a distintos tiempos: 15', 30', 1h, 2h, 4h, 6h, 12h, 24h y 48h. Las placas fueron lavadas con medio libre de suero y se les añadió simultáneamente las tres sondas fluorescentes, *Hoechst 33342*, *YO-PRO-1* y *PI* (1 µl/ml de medio) en un

volumen final de 100 μ l. Las placas fueron incubadas durante 30 minutos en hielo, y después fueron lavadas con medio antes de realizar la medición de la fluorescencia de las tres sondas fluorescentes. La medición de *YO-PRO-1* y *PI* se realizó en un FLIPR^{TETRA} usando como filtros de excitación y emisión 491 nm / 509 nm (*YO-PRO-1*) y 535 nm / 617 nm (*PI*), mientras que la medición de fluorescencia de *Hoechst 33342* se realizó en un Victor2TM, utilizando como filtros de excitación y emisión 350 nm y 461 nm respectivamente. Estas mismas placas fueron utilizadas para adquirir fotografías en un microscopio invertido de fluorescencia Axiovert200TM.

Se calculó el ratio de la fluorescencia emitida por estas tres sondas en los pocillos tratados con las ACGs y la *rotenona* con respecto al control negativo de DMSO/etanol, que se consideró el nivel basal de fluorescencia.

5. ESTUDIOS DE SEGURIDAD DE FÁRMACOS

5.1. CANAL DE SODIO Nav1.5

Para la medición del estado del canal de sodio Nav1.5 se utilizó un ensayo funcional basado en la tecnología FRET (del inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, Figura 2) (Felix *et al.* 2004; Huang *et al.* 2006).

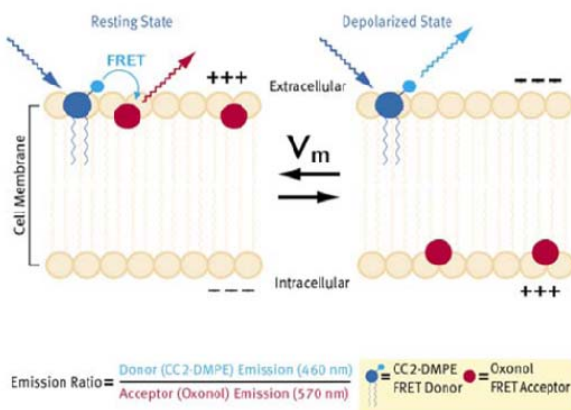


Figura 2. Fundamento del ensayo funcional del canal Nav1.5. El fluorocromo donador CC2-DMPE se une a la parte exterior de la membrana plasmática. El aceptor (*oxonol*) es móvil y está cargado negativamente, por lo que se puede unir a ambas partes de la membrana plasmática dependiendo del potencial de membrana. Cuando el CC2-DMPE es excitado genera una señal que podrá excitar al *oxonol* si ambas sondas están suficientemente próximas. Esta es la situación cuando la membrana está en el potencial de reposo. Sin embargo, cuando la membrana se despolariza (por la entrada de iones Na^+), el *oxonol* pasa a la parte interna de la membrana, se rompe la transferencia de energía y solo se detecta la señal de CC2-DMPE.

Para realizar el ensayo, células HEK293 transformadas que expresan el canal Nav1.5 se sembraron en placas de poli-D-lisina opacas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas. Después de este tiempo, el medio fue eliminado manualmente y las placas fueron lavadas con 100 μ l de tampón VIPR_PBS (1 litro

PBS, glucosa 10 mM, Hepes/NaOH 10 mM, pH 7.2). A continuación se añadió un primer fluorocromo (*CC2_DMPE* 5 μ M) disuelto en VIPR_PBS, que se dejó incubar 45 minutos. El fluorocromo se eliminó de las placas manualmente y éstas fueron lavadas con tampón VIPR-salino (NaCl 165 mM, KCl 4.5 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1 mM, Hepes/NaOH 10 mM, glucosa 10 mM, pH 7.2). Se añadió el segundo fluorocromo (10 μ M *oxonol* (*DisBac2(3)*) disuelto en VIPR-salino) junto con los compuestos (preparados según el apartado 2.3) a una dilución 1:200 (2 μ l de compuesto/400 μ l *oxonol* 10 μ M) utilizando una estación BiomekFXTM. De esta mezcla, 100 μ l fueron pipeteados a 3 placas de células, según se indica en el apartado anterior. Las células se dejaron incubar durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación las placas fueron leídas en una estación *Voltage Ion Probe Reader* (VIPR II)TM (Aurora), que añadió 25 μ M de *veratradina* (una neurotoxina que abre los canales de sodio), leyendo de manera continua durante 50 segundos (Figura 3).

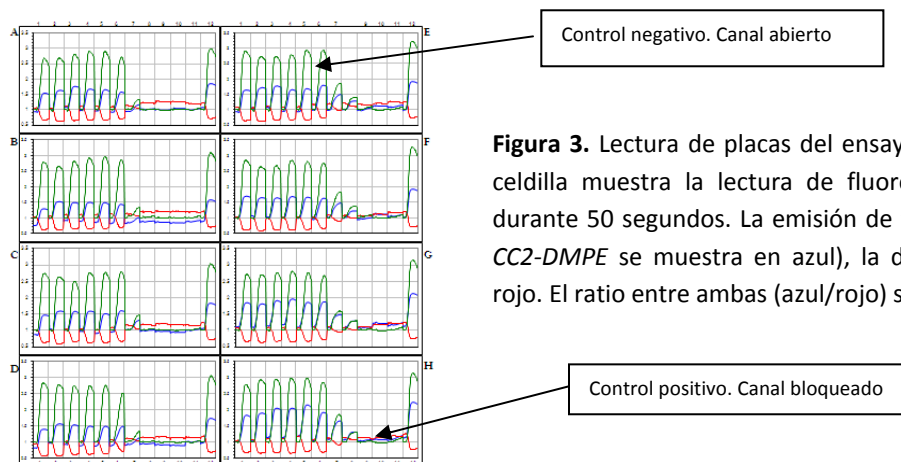


Figura 3. Lectura de placas del ensayo funcional Nav1.5. Cada celdilla muestra la lectura de fluorescencia en cada pocillo durante 50 segundos. La emisión de fluorescencia de la sonda *CC2-DMPE* se muestra en azul, la del *oxonol* (*DisBAC₂(3)*) en rojo. El ratio entre ambas (azul/rojo) se muestra en verde.

Como control positivo se utilizó la *TTX* (1 μ M) y como control negativo DMSO 0.3% / etanol 0.2%. Los datos fueron analizados mediante el programa de cálculo ScreenerTM (Genedata). Se calculó un valor basal como la media de los valores a 2-5 segundos para cada una de las sondas, y como valor máximo la media a 30-32 segundos. El ratio entre estos dos valores para cada sonda fue utilizado para calcular el % de inhibición a cada concentración, y la determinación de la CI_{50} de cada compuesto (Figura 4).

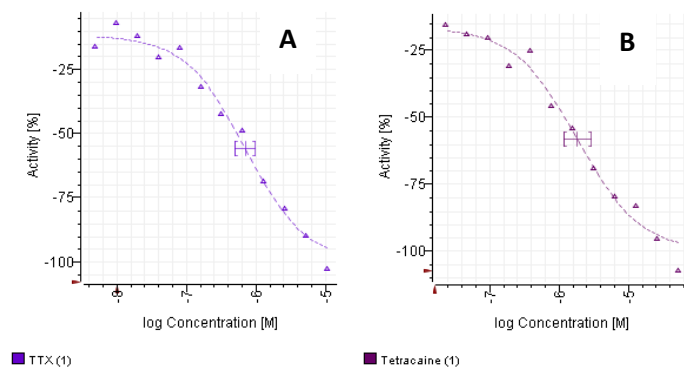


Figura 4. Ejemplos de curvas dosis-respuesta de los compuestos estándar empleados en el ensayo funcional Nav1.5. **A.** TTX; **B.** Tetracaína.

5.2. CANAL DE CALCIO TIPO L Cav1.2

Los canales de calcio dependiente de voltaje permiten el flujo de calcio a través de la membrana plasmática bajo el gradiente electroquímico correspondiente al canal abierto. Existen tres clases de bloqueantes de los canales de calcio tipo L; dihidropiridinas, benzotiazepinas y fenilalquilaminas. Estas tres clases de bloqueantes del canal de calcio son químicamente distintos y se unen a diferentes sitios bien definidos, con distinta localización topográfica en la subunidad α_{1c} del poro (Figura 5).

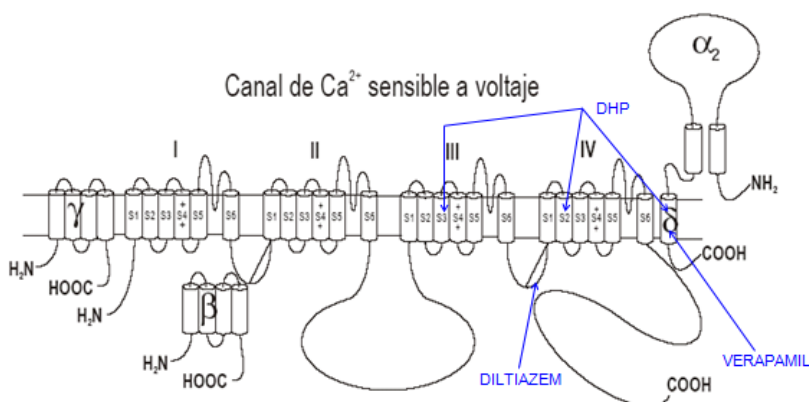


Figura 5. Subunidades del canal de calcio tipo L humano y sitio de unión de las tres clases de bloqueadores del canal. DHP: dihidropiridinas.

Con el fin de estudiar las posibles interacciones entre el canal de calcio tipo L y las ACGs o la *rotenona*, se realizaron dos tipos de ensayos, de unión receptor-ligando (con distintos ligandos), y de tipo funcional, donde se determinó el flujo de iones calcio a través del canal Cav 1.2.

5.2.1. Ensayos de unión receptor-ligando

Como fuente del canal de calcio de tipo L se utilizaron membranas de músculo esquelético de conejo. Debido a la existencia de múltiples sitios de unión a ligando en este canal, se seleccionaron tres ensayos distintos destinados a caracterizar cada uno de estos sitios de unión.

- Sitio de unión a benzotiazepinas. Se utilizó como ligando radiactivo [^3H]-*diltiazem* (NEN), y como ligando no radiactivo [^1H]-*diltiazem* (Sigma Aldrich) (Glossmann *et al.* 1983).
- Sitio de unión a dihidropiridinas. Se utilizó como ligando radiactivo [^3H]-*nitrendipina* (NEN), y como ligando no radiactivo [^1H]-*nitrendipina* (Sigma Aldrich) (Rogart *et al.* 1986).
- Sitio de unión de fenilalquilaminas. Se utilizó como ligando radiactivo [^3H]-*verapamilo* (NEN), y como ligando no radiactivo [^1H]-*verapamilo* (Sigma Aldrich) (García *et al.* 1984).

Para la implementación y puesta a punto de estos ensayos se hicieron curvas de concentración de receptor y de ligando, así como una cinética a distintos tiempos de incubación, con el fin de establecer los parámetros adecuados para cada ensayo.

Las membranas purificadas de músculo esquelético se descongelaron y se pasaron por aguja de 3 a 4 veces para mejorar la homogenización de la preparación. Para cada ensayo se utilizó una concentración de proteína (membrana de músculo) de 25-35 μM /pocillo y una concentración de ligando de 11 nM de [^3H]-*diltiazem*, 0.3 nM de [^3H]-*nitrendipina* o 4.2 nM de [^3H]-*verapamilo*. Los compuestos, preparados como se describe en el apartado 2.3, fueron añadidos utilizando una estación Aquarius96TM a una dilución 1:200, en un volumen final de ensayo de 500 μl en tampón Tris 50 mM, pH 7.4, estando los compuestos ensayados por triplicado en curvas de 6 puntos (diluciones 1:2) a una concentración máxima de 50 μM . Las placas se incubaron a 25°C en agitación durante 1 hora (Glossmann *et al.* 1983). La mezcla se filtró usando un Harvester FiltermateTM añadiendo 2 ml de tampón Tris 50 mM a 4°C, utilizando placas de filtro GF/C previamente tratadas durante 1 hora con 0.33% PEI. Las placas de filtro se dejaron secar durante 3 horas a 45°C y se leyeron en un TopCountTM tras añadir 60 μl de líquido de centello *Microscint-0*.

Como control positivo (unión no específica) se utilizó *diltiazem* 20 μM para el ensayo del sitio de unión a benzotiazepinas, *nitrendipina* 20 μM para el ensayo del sitio de unión a dihidropiridinas, *verapamilo* 20 μM para el ensayo del sitio de unión a fenilalquilaminas, y DMSO 0.3% / etanol 0.2% como control negativo en todos los casos. Con estos datos se calculó el % de inhibición para cada concentración de las

ACGs y *rotenona* y a continuación la CI_{50} de cada compuesto, utilizando para ello el programa de cálculo ADATM.

5.2.2. Ensayos funcionales

El ensayo funcional del canal de calcio se realizó en dos condiciones distintas, en condiciones de reposo de la célula (-70 mV) y en condiciones de semi-despolarización (-35 mV), en la cual podemos encontrar canales en estado inactivado y abierto. En esta última situación se favorece la unión de todos los tipos de bloqueantes de canales de calcio, incluyendo dihidropiridinas, fenilalquilaminas y benzotiazepinas (Figura 6).

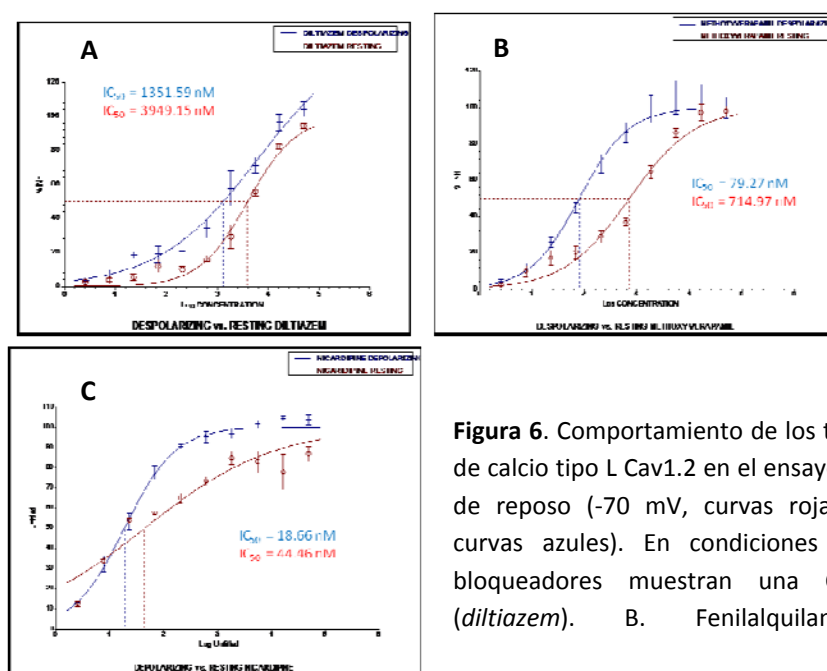


Figura 6. Comportamiento de los tres tipos de bloqueadores del canal de calcio tipo L Cav1.2 en el ensayo funcional realizado en condiciones de reposo (-70 mV, curvas rojas) y semi-despolarización (-35mV, curvas azules). En condiciones de semi-despolarización los tres bloqueadores muestran una CI_{50} inferior. A. Benzotiazepinas (*diltiazem*). B. Fenilalquilaminas (*metoxiverapamil*). C.

Para realizar estos ensayos se utilizaron células HEK293 que expresan, además del canal Cav1.2, el canal de K^+ rectificador Kir 2.3, lo cual asegura que el potencial de membrana pueda ser controlado por concentraciones externas de K^+ . Un incremento en la concentración de potasio extracelular incrementa el flujo de Ca^{2+} a través de los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje, debido a la despolarización de la membrana celular. Estas células responden al aumento del K^+ extracelular con un rápido incremento en la concentración de Ca^{2+} interno (Xia *et al.* 2004). El flujo de calcio se midió utilizando la sonda fluorescente *Fluo-4-AM*, según se ha descrito en el apartado 4.4. La señal originada por el *Fluo-4-AM* fue medida en un VIPR II durante 60 segundos.

Los compuestos se prepararon según se ha indicado en el apartado 2.3 y se añadieron a una dilución 1:200 (2 μ l de compuesto / 400 μ l de tampón de ensayo) mediante una estación BiomekFX™, según se describe en el apartado 5.2. Como control positivo se utilizó *isradipina* 250 nM y como control negativo DMSO / etanol a la misma concentración que en las muestras con ACG o *rotenona*.

- A. Ensayo en condiciones de semi-despolarización (-35mV). Las placas de células se lavaron con *Potassium Pre-polarization Buffer I* (PPB I) 100 μ l/pocillo (NaCl 146.2 mM, KCl 5.8 mM, CaCl₂ 5 μ M, MgCl₂ 1.7 mM, Hepes 10 mM, pH 7.2). Se añadieron 160 μ l/pocillo de 4 μ M *Fluo-4* con 0.02% ácido plurónico (MolecularProbes P-3000™) previamente preparado en PPB I suplementado con glucosa 10 mM. Las células con *Fluo-4* se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Se retiró el *Fluo-4* y las células se lavaron 2 veces con 100 μ l/pocillo de *Potassium Pre-polarization Buffer II* (PPB II) (NaCl 127mM, KCl 25 mM, CaCl₂ 5 μ M, MgCl₂ 1.7 mM, Hepes 10 mM, pH 7.2). El aumento en la concentración de K⁺ generó el estado de semi-despolarización. A continuación se añadieron los compuestos mediante una estación BiomekFX™ a una dilución 1:200 (2 μ l de compuesto / 400 μ l de PPB II). De la mezcla, 100 μ l fueron pipeteados a 3 placas de células. Las placas se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La señal de fluorescencia emitida por el *Fluo-4* unido al calcio citosólico fue registrada por un FLIPR^{TETRA}, indicando en cada pocillo los cambios en la concentración intracelular de Ca²⁺, 60 segundos después de la adición de 25 μ l de *Ca Trigger Buffer* (CTB) (NaCl 119 mM, KCl 25 mM, CaCl₂ 4 mM, MgCl₂ 1.7 mM, Hepes 10 mM, pH 7.2).
- B. Ensayo en condiciones de reposo (-70 mV). La primera parte del ensayo se realizó en las mismas condiciones que las descritas en el apartado anterior. Sin embargo en este caso, una vez que las células fueron incubadas con *Fluo-4-AM*, éste se retiró de las placas y las células se lavaron dos veces con 100 μ l/pocillo de PPB I, que contiene una baja concentración de potasio, lo cual permite que las células mantengan el potencial en estado de reposo. A continuación se añadieron los compuestos disueltos en PPB I, siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado anterior, realizándose igualmente su lectura en el FLIPR^{TETRA}.

Los datos fueron analizados mediante el programa de cálculo Screener™ (Genedata). Se calculó el valor basal como la media de los valores a 2-5 segundos, y el valor máximo como la media a 30-32 segundos. El ratio entre estos dos valores se empleó para el cálculo del % de inhibición a cada concentración y la determinación posterior de la Cl₅₀ para cada uno de los compuestos (Figura 7).

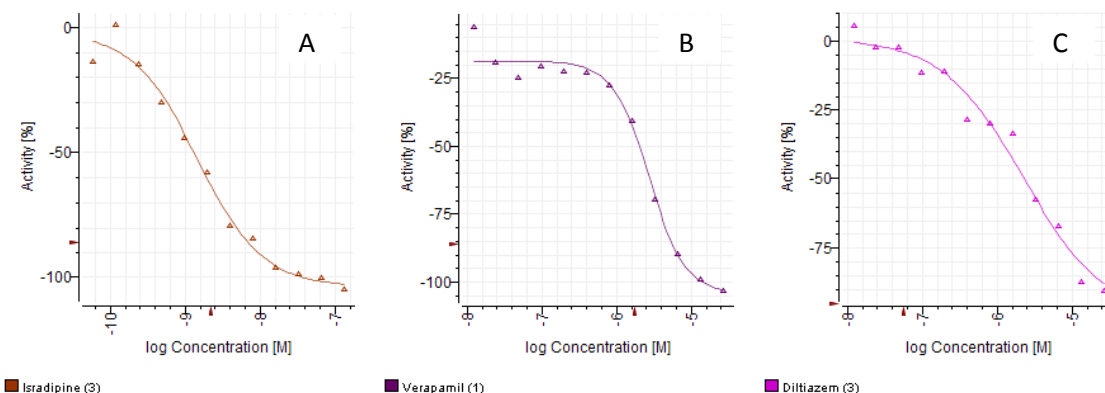


Figura 7. Ejemplos de curvas dosis-respuesta del ensayo funcional del canal Cav1.2 para tres agentes bloqueantes, obtenidos con el programa Screener™. **A.** *Isradipina*; **B.** *Verapamilo*; **C.** *Diltiazem*.

5.3. CANAL DE POTASIO hERG

Para el estudio de este canal se realizaron dos ensayos distintos, uno de unión receptor-ligando y otro funcional.

5.3.1. Ensayo de unión receptor-ligando

Como fuente de canal de potasio hERG se utilizaron membranas purificadas de células HEK293 transformadas, que tienen una alta expresión de hERG. Para el ensayo se utilizó una concentración de proteína (membranas) de 25-40 μM /pocillo y una concentración de 25 pM del radioligando [^{35}S]-MK499 (Figura 8) (Raab *et al.*, 2006), un bloqueador del canal de potasio hERG de alta afinidad (Butcher *et al.* 2005; Fernandez *et al.* 2004).

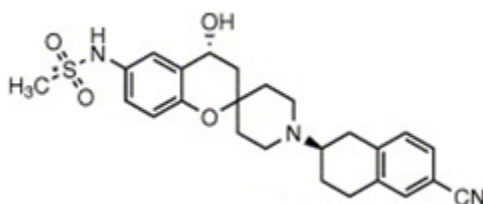


Figura 8. Estructura del [^{35}S]- (+)-N-[1'-(6-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-2(R)-naftalenil)-3,4-dihidro-4(R)-hidroxispiro [2H-1-benzopiran-2,4'-piperidina]-6-il] metanosulfonamida, [^{35}S]-MK499.

Los compuestos preparados como se describe en el apartado 2.3 fueron añadidos utilizando una estación de dispensación de líquidos Aquarius96™ (Tecan) a una dilución 1:200, estando los compuestos ensayados por triplicado en curvas de 6 puntos (diluciones 1:2) a una concentración máxima de 50 μM , en un volumen total de ensayo de 1 ml/pocillo en tampón Hepes 10 mM, pH 7.4 a temperatura

ambiente. Las placas se incubaron a 25°C en agitación durante 2 horas. La mezcla se filtró utilizando un Harvester Filtermate™ (PerkinElmer), añadiendo 2.5 ml de tampón Hepes 10 mM a 4°C a placas de filtro GF/B (PerkinElmer) previamente tratadas durante 1 hora con 0.33% de *polietilenimina* (PEI) (Sigma Aldrich). Las placas de filtro se dejaron secar durante 3 horas a 45°C y se leyeron en un TopCount™ (PerkinElmer) añadiendo 60 µl de líquido de centello *Microscint-20* (PerkinElmer). Como control positivo utilizamos *astemizol* (1 µM) y como control negativo DMSO 0.3% / etanol 0.2%.

Los datos fueron analizados utilizando el programa de cálculo ADA™, como en el apartado 3.1, tomando como 100% de bloqueo del canal (control positivo) el tratamiento con 1 µM *astemizol* y como 0% de bloqueo del canal (control negativo) el solvente. Con estos datos se calculó el % de inhibición a cada concentración, aplicando la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Control negativo} - \text{Compuesto}}{\text{Control negativo} - \text{Control positivo}} \times 100$$

A continuación y usando el algoritmo de *Levenberg-Marquardt* para ajustar la curva de dosis-respuesta, se calculó la CI_{50} de cada compuesto, interpolando en la curva obtenida.

5.3.2. Ensayo funcional

Para caracterizar mejor el comportamiento del canal de potasio hERG en presencia de las ACGs y la *rotenona* se utilizó un ensayo funcional basado en la utilización de una sonda fluorescente (*FluxOR*™, Invitrogen) que emite fluorescencia tras su unión a iones talio (Beacham *et al.* 2010). El *FluxOR*™ está protegido por grupos AM que impiden la fluorescencia fuera de la célula. Cuando entra en la célula, las esterasas del citosol eliminan los grupos AM, y el *FluxOR*™ pasará a su forma activa en la que es capaz de unir el talio, que pasa al citoplasma a través del canal hERG (Figura 9), resultando en la emisión de fluorescencia.

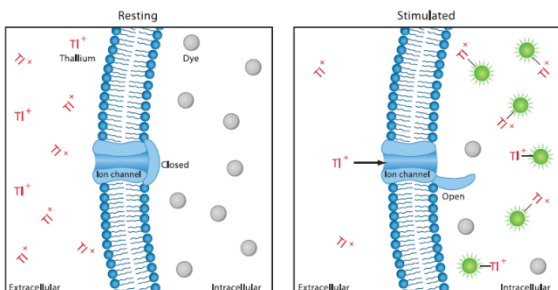


Figura 9. Fundamento de ensayo funcional del canal hERG utilizando la sonda fluorescente *FluxOR*™.

Las células HEK293 expresando el canal hERG se sembraron en placas negras de 96 pocillos tratadas con poli-D-lisina y se dejaron incubando durante 24 horas. Después de este tiempo, las placas fueron lavadas con tampón de ensayo (NaCl 165 mM, KCl 4.5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1mM, Hepes 10 mM y glucosa 10 mM, pH 7.4). A continuación se añadieron 80 µl de *FluxOR*TM disuelto en tampón de ensayo. El fluorocromo se dejó incubando con las células durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las placas con 100 µl de tampón de ensayo y se añadieron los compuestos a una dilución 1:200 (2 µl de compuesto / 400 µl de tampón de ensayo) utilizando una estación BiomekFXTM. De la mezcla, 100 µl fueron pipeteados a 3 placas de células, estando los compuestos ensayados por triplicado en curvas de 6 puntos (diluciones 1:2) a una concentración máxima de 50 µM. Las placas fueron incubadas con los compuestos 30 minutos y a continuación se leyeron en un FLIPR^{TETRA}, el cual añadió 20 µl de tampón de estímulo (Ti₂SO₄ + K₂SO₄), y realizó la lectura de la fluorescencia durante 120 segundos (Figura 10), permitiendo analizar la cinética del canal.



Figura 10. Ejemplo de lecturas de una placa del ensayo funcional hERG. La figura muestra el nivel de fluorescencia en cada pocillo de la placa durante la lectura de 120 segundos. En aquellos pocillos donde el canal de potasio está abierto éste permite pasar el talio, obteniendo altos valores de fluorescencia. Al bloquear el canal de potasio se obtienen valores inferiores de fluorescencia. Como control positivo se utilizó *astemizol* (2 µM) y como control negativo DMSO 0.3% / etanol 0.2%.

Los datos fueron analizados utilizando el programa de cálculo ScreenerTM (Genedata). Se calculó el valor basal como la media de los valores a 2-5 segundos, y el valor máximo como la media a los 90-92 segundos. El ratio entre estos dos valores fue el utilizado para el cálculo posterior del % de inhibición a cada concentración, para la determinación de la CI₅₀ de cada compuesto (Figura 11).

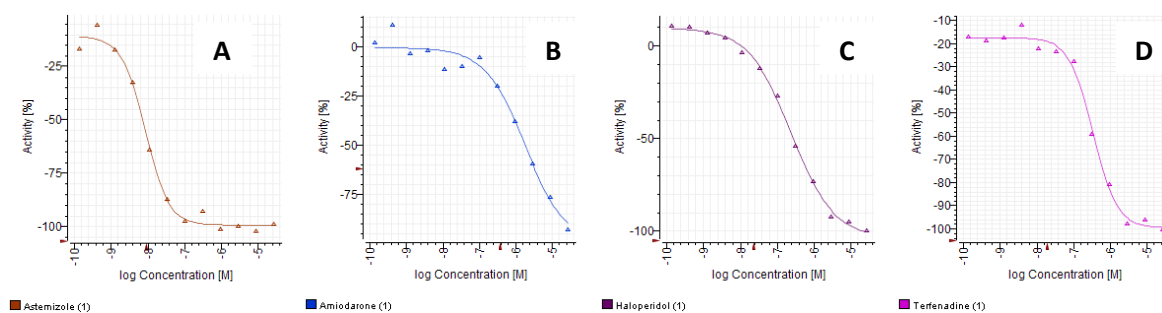


Figura 11. Ejemplos de curvas dosis-respuesta de los compuestos estándar utilizados durante el ensayo funcional del canal hERG. **A.** *Astemizol*; **B.** *Amiodarona*; **C.** *Haloperidol*; **D.** *Terfenadina*.

1. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD MEDIANTE EL ENSAYO DE MTT

Las acetogeninas han sido descritas previamente como compuestos con potente actividad citotóxica sobre células tumorales (Liu *et al.* 2007; Yang *et al.* 2009). Para iniciar el estudio sobre el mecanismo de acción de las ACGs, se realizó el ensayo de MTT sobre 8 líneas celulares con 18 compuestos pertenecientes a 7 familias de ACGs con estructuras químicas diversas (Introducción, sección 1). Con este ensayo pretendíamos caracterizar la actividad citotóxica de las ACGs sobre un amplio espectro de líneas celulares. En la Tabla 1 se muestran los datos de DE₅₀ (dosis efectiva para provocar el 50% de muerte celular) obtenidos en este ensayo. Se utilizaron varios controles de referencia (*actinomicina D*, *doxorubicina*, *MMS* y *rotenona*), como control negativo se utilizó DMSO al 0.5%.

Tabla 1. Actividad citotóxica de 18 ACGs frente a 6 líneas celulares tumorales y 2 líneas no-tumorales (CCL 204 y CRL8798) en un ensayo de MTT. El dato de DE₅₀ es la media entre triplicados, se indica la desviación estándar para cada caso. Los colores marcan las distintas familias de ACGs. NT (no tumoral)

	Actividad citotóxica DE ₅₀ (μM): Media±Stdv							
	A549 pulmón	HepG2 hígado	HT29 colón	MES-SA útero	MES-SA/Dx5 útero	MCF-7 mama	CCD 16 Lu pulmón NT	184A1 mama NT
<i>laherradurin</i>	41±11	68±14	198±9	53±2	85±3	102±13	>500	>500
<i>almuñequin</i>	112±28	1.6±0.5	28±4	16±3	78±1	7.1±1.8	480±20	7.1±1.1
<i>aromin</i>	87±13	130±22	69±3	64±2	43±3	30±11	137±19	22±1.2
<i>cherimolin-1</i>	55±10	1.1±0.2	42±8	23±2	34±3	17±5	103±22	0.15±0.05
<i>guanaconetin-1</i>	>277.5	71±9	>277.5	>277.5	>277.5	36±9	>277.5	>277.5
<i>guanaconetin-3</i>	34±4	7.1±3.5	171±38	32±1	46±6	15±3	>500	4.7±0.8
<i>guanaconetin-4</i>	31±2	5.4±3.1	>500	>500	226±18	13±4	>500	27±13
<i>motrilin</i>	33±12	1.8±0.6	150±12	27±2	53±4	26±7	>500	51±3
<i>rolliniastatin-1</i>	>500	12±2	160±36	>500	52±9	17±2	46±33	237±122
<i>squamocin</i>	>500	7.5±0.7	23±1	17±4	18±1	14±4	22±5	0.34±0.16
<i>iso-rolliastatin-1</i>	>500	12±8	457±32	99±15	54±5	28±8	>500	327±107
<i>annonacin</i>	88±7	4.3±1.5	34±1	17±3	18±2	27±10	11±5	8.6±0.7
<i>annonacin-A</i>	>286.7	8.8±2.6	43±3	30±2	36±1	4.7±0.7	49±6	8.4±1.3
<i>annonacinona</i>	126±44	20±10	74±7	59±4	62±1	17±3	70±4	21±2
<i>densicomacin</i>	91±7	2.3±0.8	29±3	9.3±1.6	20±2	24±12	20±2	0.23±0.05
<i>gigantetronenin</i>	149±7	7.4±0.1	44±3	30±1	36±1	17±2	21±6	13±3
<i>iso-annonacin</i>	132±22	23±12	57±2	26±5	30±1	12±1	>500	13±5
<i>iso-annonacinona</i>	84±11	11±2	138±8	6.9±1.7	21±1	6.2±0.6	230±29	147±19
<i>actinomicina D</i>	204±15	91±10	183±20	82.4±11	19±2	4.3±1	158±23	115±121
<i>doxorubicina</i>	128±12	86±8	214±27	155±15	>500	21±3	85±12	399±41
<i>MMS</i>	326±17	481±21	640±18	422±21	990±42	321±32	559±27	422±28
<i>rotenona</i>	29±4	26±4	187±16	443±20	206±19	79±12	215±21	132±23

Dentro de la familia de las ACGs bis-tetrahidrofuránicas adyacentes con γ -lactona α,β -insaturada (*motrilin*, *rolliniastatin-1*, *squamocin*, *guanaconetin-1*, *guanoconetin-3* y *guanaconetin-4*), la que presentó mayor actividad citotóxica frente a las líneas tumorales fue *squamocin*. Cabe destacar la falta de actividad citotóxica de *guanaconetin-1*, la cual solo mostró actividad frente a la línea tumoral de mama (MCF-7) e hígado (HepG2), la línea celular más sensible frente a esta familia de compuestos. *Guanaconetin-3*, *guanaconetin-4* y *motrilin* presentaron una $DE_{50} \approx 30 \mu M$ frente a la línea tumoral de pulmón (A549), sin embargo, no mostraron actividad frente a la línea no tumoral de este mismo órgano (CCD 16 Lu).

Almuñequin, *cherimolin-1* y *aromin* (ACGs bis-tetrahidrofuránicas no adyacentes con γ -lactona α,β -insaturada) presentaron actividad citotóxica frente a todas las líneas celulares. *Almuñequin* y *cherimolin-1* mostraron un perfil de citotoxicidad muy similar, con DE_{50} muy cercanas (< 3 veces de diferencia) frente a todas las líneas tumorales, mientras que *aromin* mostró mayores diferencias. *Almuñequin* y *cherimolin-1* presentaron mayor citotoxicidad frente a HepG2, mientras que *aromin* fue más potente contra MCF-7.

Laherradurin (ACG bis-tetrahidrofuránica adyacente con γ -lactona saturada, β -hidroxilada) mostró una alta actividad citotóxica frente a todas las líneas tumorales, pero no sobre las líneas celulares no tumorales.

Iso-rolliniastatin-1 (ACG bis-tetrahidrofuránica adyacente con γ -lactona saturada "tipo iso") mostró una actividad comparable con *rolliniastatin-1* frente a varias líneas tumorales (A549, HepG2, MES-SA/Dx5, MCF-7) y la línea no tumoral de mama (184A1). En contraste, presentó mayor actividad frente a MES-SA y menor sobre HT29 que *rolliniastatin-1*, y una profunda diferencia frente a la línea celular no tumoral de pulmón (CCD 16 Lu), sobre la cual la forma "iso" no exhibió actividad citotóxica detectable.

Las ACGs mono-tetrahidrofuránicas con γ -lactona α,β -insaturada α,α -dihidroxiladas (*annonacin-A*, *annonacin* y *annonacinona*), al igual que las mono-tetrahidrofuránicas con γ -lactona α,β -insaturada α -monohidroxilada (*gigantetronenin* y *densicomacin*) presentaron mayor actividad sobre HepG2 y MCF-7 y una menor actividad frente a A549. *Annonacin* fue la más potente de su grupo frente a todas las líneas celulares ensayadas excepto frente a MCF-7, donde *annonacin-A* fue más potente. Igualmente, *densicomacin* fue ligeramente más potente que *gigantetronenin* frente a casi todas las líneas celulares, aunque las diferencias fueron en general pequeñas.

Las ACGs mono-tetrahidrofuránicas con γ -lactona saturada "tipo iso" (*iso-annonacin* e *iso-annonacinona*) presentaron una actividad citotóxica frente a las líneas tumorales comparable a las obtenidas con *annonacin* y *annonacinona*, pero tenían menor actividad frente a las líneas no tumorales, a excepción de *iso-annonacin* frente a CRL8798, donde no hubo diferencias apreciables con *annonacin*.

En general, no se observa una tendencia general en relación estructura-actividad claramente definida entre las ACGs y su actividad citotóxica frente a las distintas líneas tumorales. Hay numerosos factores que pueden afectar a la actividad citotóxica de las ACGs en células tumorales en cultivo. Con el objetivo de esclarecer los detalles del proceso de muerte celular inducida por estos compuestos nos propusimos estudiar los eventos intracelulares desencadenados a tiempos cortos tras su exposición a los mismos. Sin embargo, para ello era necesario caracterizar en más detalle la cinética de la muerte celular producida por las ACGs, para lo que utilizamos un ensayo de citotoxicidad diferente al anterior, con características más apropiadas para este tipo de estudio.

2. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD MEDIANTE EL ENSAYO DE LDH

Según se ha descrito en la Introducción (sección 3), las ACGs se han clasificado en tres tipos funcionales según su sitio de unión al Complejo I mitocondrial (Tormo *et al.* 1999). Basándonos en los datos obtenidos en el ensayo de MTT y en los datos de publicaciones previas (Royo *et al.* 2003; Tormo *et al.* 2003; 2005; Chahboune *et al.* 2005; Barrachina *et al.* 2007); se seleccionaron cuatro ACGs para estudiar más en profundidad su mecanismo de acción, eligiéndose representantes con una potente actividad citotóxica y diferente sitio de unión al Complejo I mitocondrial; *cherimolin-1* (tipo A), *laherradurin* (tipo B), *motrilin* (tipo B) y *rolliniastatin-1* (tipo A/B).

Para comenzar la caracterización detallada de los compuestos seleccionados, éstos fueron ensayados a varias concentraciones en un ensayo de citotoxicidad de LDH. Este ensayo permite estudios de citotoxicidad a tiempos cortos (a partir de 15 minutos), mientras que el ensayo de MTT no es apropiado para este tipo de estudios, ya que tiene un periodo de incubación mínimo con el sustrato de 3 horas. En este primer ensayo se probaron los compuestos a varios tiempos de incubación (desde 15 minutos a 48 horas). Como línea celular para realizar el ensayo se usó HepG2, por ser la más sensible a las ACGs en el ensayo de MTT. Como compuesto de referencia se utilizó la *rotenona*, por ser un inhibidor clásico del Complejo I, cuyo mecanismo de acción ha sido estudiado en profundidad.

La *rotenona* presentó actividad citotóxica claramente observable a partir de las 12 horas, incrementándose dicha actividad de forma notable a las 24 horas, donde presentó más del 50% de muerte celular a todas las concentraciones ensayadas, y prácticamente el 100% a partir de 6,25 μ M (Figura 1).

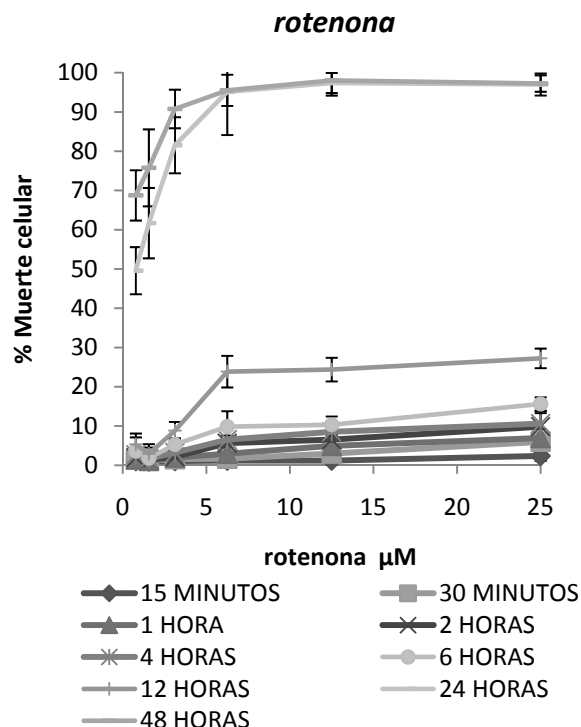


Figura 1. Efecto de la *rotenona* a distintas concentraciones y a distintos tiempos. La gráfica muestra la muerte celular originada con respecto a los controles positivo y negativo (DMSO 0.4% / etanol 0.2% como control negativo; *Triton X-100* como control positivo).

En la Figura 2 se muestra la actividad presentada por las ACGs en este mismo ensayo. *Cherimolin-1* no presentó apenas actividad citotóxica hasta las 12 horas, ni siquiera a la máxima dosis empleada (25 μM), pero después se observó un rápido aumento de dicha actividad entre las 12 y las 24 horas, alcanzando el 100% de muerte celular a las 24 horas a 25 μM . En contraste, el tratamiento con *motrilin* causa muerte celular desde una fase muy temprana, pudiéndose apreciar ya un 18% de muerte celular tras cuatro horas de tratamiento a 25 μM , y aumentando la citotoxicidad con el tiempo de manera aproximadamente lineal. *Laherradurin* presentó una actividad citotóxica menor que el resto de ACGs estudiadas, solo pudimos detectar niveles significativos de muerte celular a partir de las 24 horas. A dicho tiempo se detectó una actividad superior al 50% en las concentraciones superiores a 25 μM , pero el 100% de muerte celular sólo se consiguió a dosis superiores a 50 μM . Finalmente, *rolliniastatin-1* mostró una alta actividad citotóxica desde los tiempos más cortos de incubación, presentando un 35% de muerte celular a las 2 horas a la concentración más alta ensayada (50 μM). Al igual que en el caso de *motrilin*, el % de muerte celular creció con el tiempo de forma más o menos lineal.

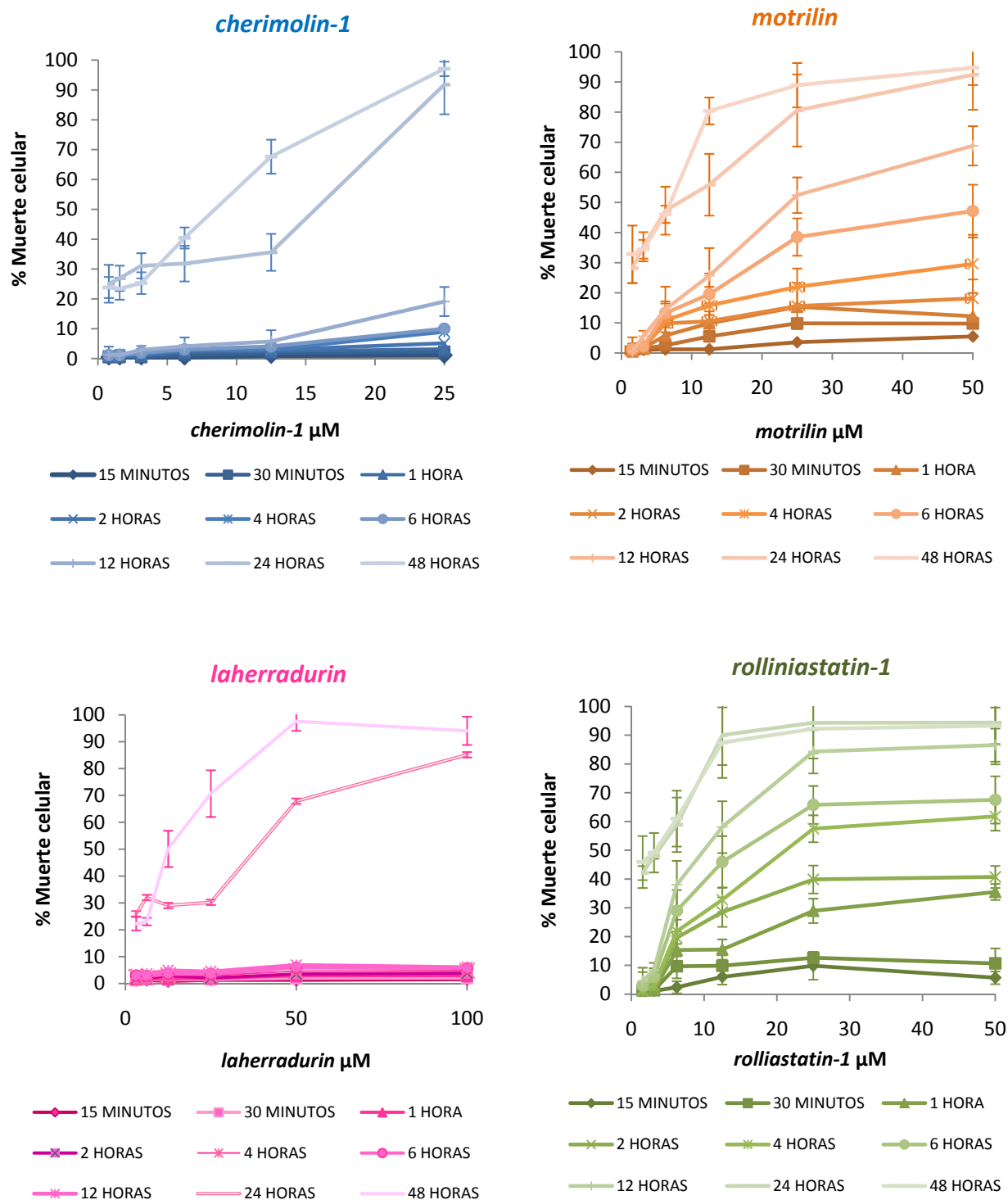


Figura 2. Efecto citotóxico de las ACGs a distintas concentraciones y a distintos tiempos de incubación, medido en un ensayo de LDH. La gráfica muestra los datos de muerte celular normalizados con respecto a los controles positivo (*Tritón X-100*) y negativo (*DMSO* 0.4% / *etanol* 0.2%).

En función de estos resultados fijamos una especial atención en dos concentraciones de compuesto (25 μM y 6.3 μM), donde vimos grandes diferencias entre las propias ACGs y la *rotenona*, y entre las ACGs entre sí. Elegimos tiempos de incubación a partir de 6 horas para poder comparar las ACGs, ya que *cherimolin-1* y *laherradurin* no mostraron citotoxicidad a tiempos más cortos. Los datos comparativos para las cuatro ACGs y la *rotenona* se muestran en la Figura 3.

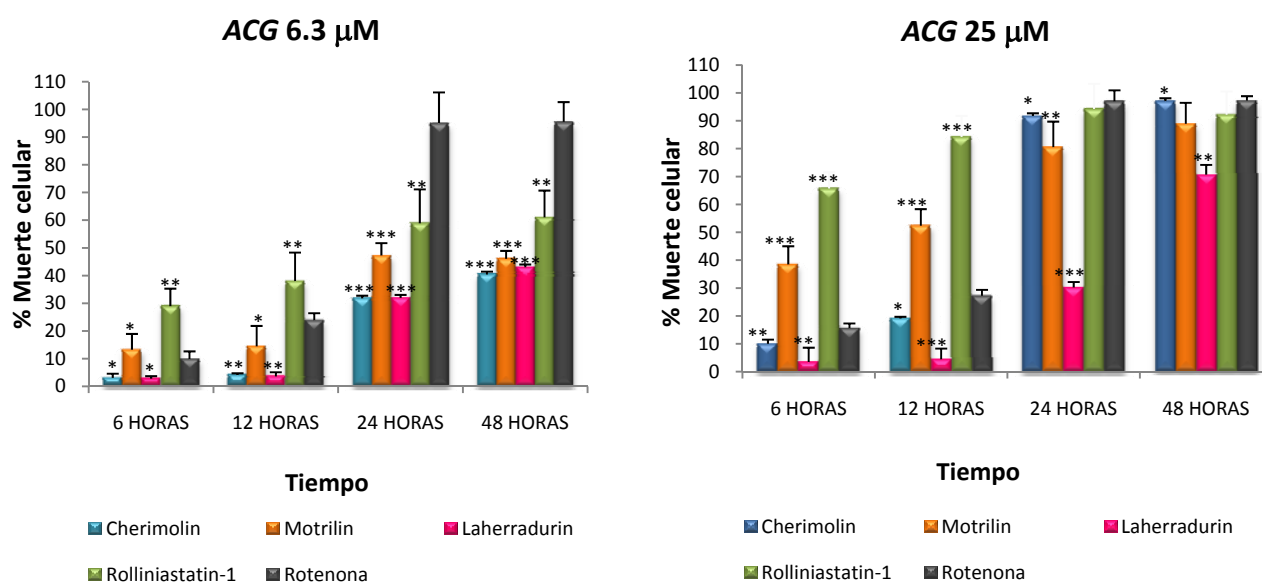


Figura 3. Efecto citotóxico de las ACGs y *rotenona* a dos concentraciones (6.3 μM y 25 μM) y a distintos tiempos de incubación. Los asteriscos indican la significancia estadística de las diferencias entre los datos de las ACGs comparados con la *rotenona* a la misma concentración y tiempo de incubación ($P^* < 0.05$; $P^{**} < 0.01$; $P^{***} < 0.001$).

A la concentración de 6.3 μM se observa un efecto similar a tiempos de 6 y 12 horas, mostrando *rolliniastatin-1* y *motrilin* mayor potencia con respecto a *laherradurin* y *cherimolin-1*. A tiempos de 24 y 48 horas la *rotenona* mostró un 100% de muerte celular, mientras que las cuatro ACGs ensayadas mostraron actividades por debajo del 60%.

A la concentración de 25 μM , se observa a las 6 horas una clara diferencia en la actividad citotóxica de las cuatro ACGs, mostrando *rolliniastatin-1* una actividad de 70% y *motrilin* del 40%, mientras que *cherimolin-1*, *laherradurin* y *rotenona* mostraron actividades $< 20\%$. A las 12 horas estas diferencias se ven más acusadas. Las diferencias dejan de ser relevantes a las 24 horas donde todos los compuestos han alcanzado ya prácticamente un 100% de muerte celular, excepto *laherradurin* con un 30% de muerte celular (que aumenta al 70% a las 48 horas).

3. DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE ATP CELULAR

Se han realizado muchos trabajos estudiando la actividad inhibitoria de las ACGs sobre el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en modelos *in vitro* (Estornell *et al.* 1992; Fato *et al.* 1996; Tormo *et al.* 1999). En estos trabajos se evaluaron sobre partículas submitocondriales de corazón de ternera dos parámetros: a) la actividad integrada NADH oxidasa (NADH Ox), con NADH como dador de electrones, donde la disminución en la depleción de absorbancia indica una disminución en la actividad del Complejo I; y b) la actividad específica NADH decilubiquinona oxidoreductasa (NADH:DB), donde los Complejos III y IV son inhibidos y se mide la disminución de la velocidad de oxidación del NADH (Estornell *et al.* 1992).

Tabla 2. Cl_{50} de las cuatro ACGs seleccionadas y *rotenona* en dos ensayos de inhibición del Complejo I mitocondrial.

	NADH Ox (nM) Cl_{50}	NADH:DB (nM) Cl_{50}
<i>cherimolin-1</i> **	1.84 ± 0.27	5.18 ± 0.63
<i>motrilin</i> **	0.41 ± 0.04	0.81 ± 0.13
<i>laherradurin</i> **	0.18 ± 0.02	0.29 ± 0.01
<i>rolliniastatin-1</i> *	0.62 ± 0.04	0.74 ± 0.04
<i>rotenona</i> *	5.1 ± 0.9	28.8 ± 1.5

*Tormo *et al.* 1999 ** Tormo *et al.* 2001

Apoyándonos en estos datos (Tabla 2), en los que quedaba demostrado que las ACGs inhiben el Complejo I mitocondrial con mayor potencia que la *rotenona*, quisimos ver si esta inhibición tenía como consecuencia una disminución correlativa en la cantidad de ATP celular debido a su influencia en la CTE mitocondrial. Por ello medimos la concentración de ATP celular a distintos tiempos tras el tratamiento con los compuestos.

En la Figura 4 se puede observar un descenso en la concentración de ATP, que se hace más acusado a lo largo del tiempo para todas las ACGs y la *rotenona*, comparándolo con el control negativo del solvente. Esto parece confirmar que la inhibición del Complejo I resulta efectivamente en una disminución de la capacidad de síntesis de ATP. Sin embargo a los tiempos de incubación ensayados, la interpretación de los datos podía ser ambigua, ya que el ensayo de LDH señala también la existencia de muerte celular (Figura 3), por lo que la disminución de ATP podía deberse también al menor número de células viables.

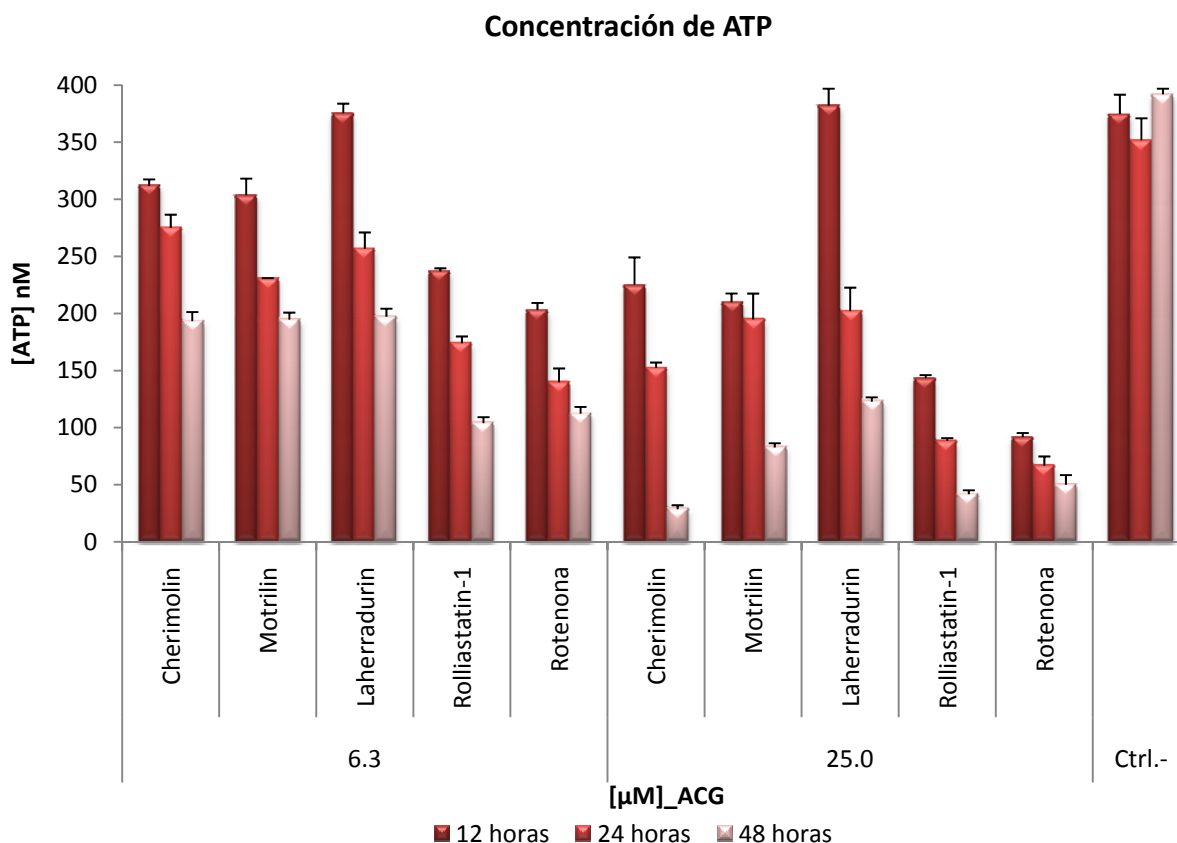


Figura 4. Determinación de la concentración celular de ATP celular tras el tratamiento a 12, 24 y 48 horas con ACGs o *rotenona* a dos concentraciones (6.3 μM y 25 μM).

En consecuencia, decidimos estudiar el efecto de cada ACG sobre la concentración de ATP en unas condiciones en las que, según el ensayo de LDH, no se observara un efecto muy marcado sobre la viabilidad celular. Elegimos para ello tiempos de incubación en los que a la mayor concentración no se superase el 20% de muerte celular, tiempos que fueron distintos para cada ACG, ya que no todas ellas produjeron efecto citotóxico a los misma velocidad.

En la Figura 5 puede verse que todas las ACGs y la *rotenona* provocaron una patente disminución en la concentración de ATP celular, incluso a dosis y tiempos de incubación en los que el % de muerte celular era muy pequeño. En condiciones de menos de un 20% de muerte celular, se observó una disminución de ATP del 40-50% en todos los casos, lo cual nos indicaba que el bloqueo del Complejo I, y por tanto de la CTE, influía directamente en la producción de ATP celular.

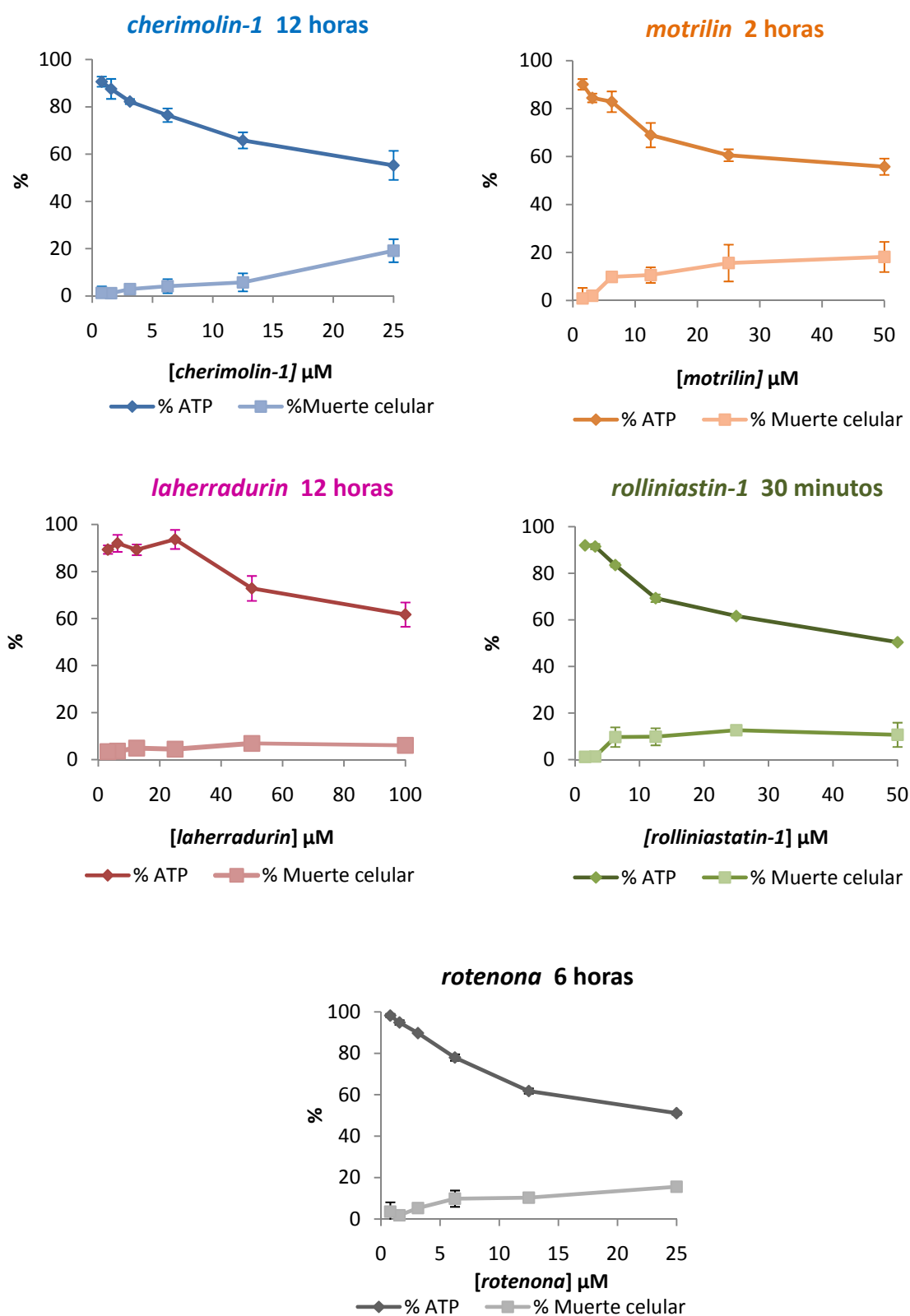


Figura 5. Disminución de la concentración de ATP en relación a la muerte celular, producidos por el tratamiento con ACGs o rotenona. Para poder comparar ambos datos, las concentraciones de ATP se expresaron como % con respecto al control negativo del solvente (0.3% DMSO/0.2% etanol), tomado como 100%.

4. PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs) Y SUPERÓXIDOS

Otra de las consecuencias descritas repetidamente que se dan al inhibir el Complejo I es la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y de radicales superóxidos (Dykens *et al.* 1994). Por ello, realizamos dos ensayos para comprobar si este efecto era también provocado por las ACGs, y medir su magnitud.

En la Figura 6 (panel A) se puede ver que transcurrida 1 hora de incubación con *cherimolin-1*, *motrilin* y *rolliniastatin-1* a 6.3 μ M, se observaba un aumento en la producción de EROs en torno al 50%. *Rotenona* a este tiempo mostró un efecto significativamente menor, y *laherradurin* no mostró prácticamente un aumento apreciable. A partir de las 3 horas, sin embargo, *cherimolin-1*, *motrilin*, *laherradurin* y *rotenona* alcanzaron valores equiparables, duplicando aproximadamente el valor basal. En el caso de *rolliniastatin-1* obtuvimos valores decrecientes a las 12 horas. A este tiempo esta ACG produce más de un 50% de muerte celular (Figura 2), lo que explicaría la menor cantidad de fluorescencia detectada en este caso.

A la dosis superior ensayada (25 μ M), el efecto sobre la producción de EROs a tiempos cortos fue relativamente similar para todos los compuestos, aunque todavía fue ligeramente menor para *rotenona* y *laherradurin*. La disminución observada a tiempos más largos para *rolliniastatin-1* fue aún más pronunciada. Este mismo efecto de disminución de la fluorescencia, aunque menos acusado, se observó en el resto de ACGs y en la *rotenona* a tiempos más largos, coincidiendo con la detección de muerte celular.

De igual forma, se puede ver que después de 1 hora de incubación se producen también altas concentraciones de radicales superóxidos (Figura 6, panel B). A este tiempo, todas las ACGs, al igual que la *rotenona*, mostraron en torno al 50% de aumento en la concentración de radicales superóxidos sobre el nivel basal, a la dosis más baja ensayada, y más de un 70% de aumento a la dosis más alta. A las 3 horas estos niveles llegan a duplicar los niveles basales. De forma similar a lo observado con la producción de EROs, a las 6 horas se observó una disminución de fluorescencia en *motrilin* y en *rolliniastatin-1*, debido a la menor cantidad de células en pocillo, originada por la actividad citotóxica de estas dos ACGs a este tiempo (47% en *motrilin* y 67% en *rolliniastatin-1*).

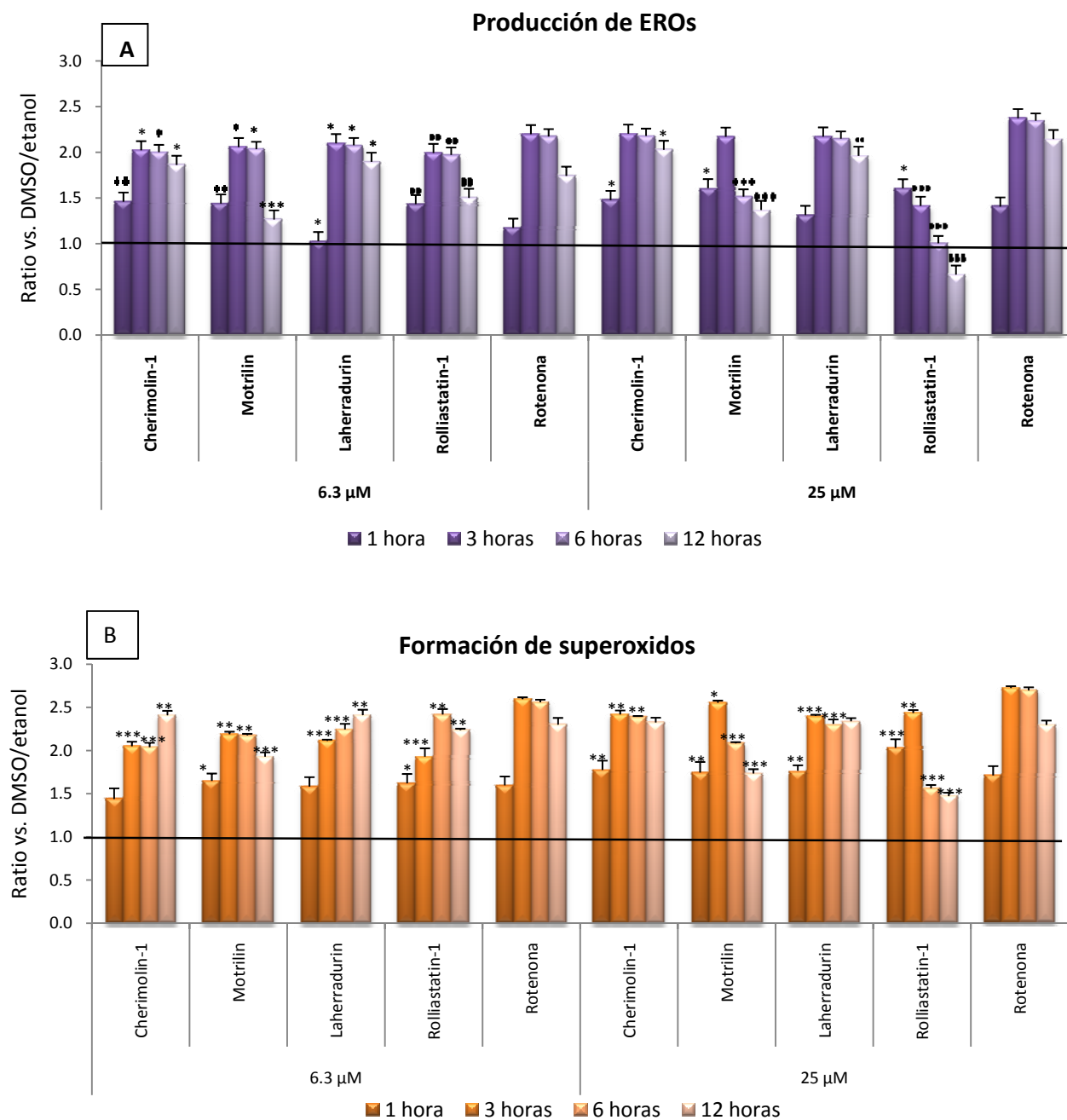


Figura 6. Formación de EROs y radicales superóxidos, producida en células HepG2 tras el tratamiento con distintas ACGs y *rotenona*, a distintos tiempos y concentraciones. Se determinó el ratio de formación de EROs con respecto al control negativo del solvente. Los asteriscos indican el nivel de significancia estadística de los datos de las ACGs en relación a la *rotenona* ($P^* < 0.05$; $P^{**} < 0.01$; $P^{***} < 0.001$).

En la Figura 7 pueden verse las fotografías tomadas a 1 y 3 horas de incubación con las ACGs, junto con la *rotenona* y el control negativo, en las que se observan los efectos descritos anteriormente.

EROS 1h	EROS 3h	SUPERÓXIDOS 1h	SUPERÓXIDOS 3h
---------	---------	----------------	----------------

Figura 7. Imágenes de microscopía de fluorescencia debida a la producción de EROs y radicales superóxidos en células HepG2 incubadas a distintos tiempos con *ACGs* y *rotenona*. Las columnas A y B muestran la fluorescencia de la sonda *DCDHF₂DA*, que detecta EROs, después de 1 y 3 horas de incubación con los compuestos, respectivamente. En la columna C y D se muestra la fluorescencia de la sonda *DHE*, proporcional a la concentración de radicales superóxidos, a 1 y 3 horas respectivamente. Al pie se muestran los controles basales en presencia del solvente.

5. COLAPSO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

La inhibición del Complejo I mitocondrial, y por lo tanto de la CTE, afecta al transporte de protones a través de la membrana, lo que conlleva una pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y su colapso. Este proceso se puede estudiar mediante la sonda fluorescente *JC-1*, que se acumula en la mitocondria en forma de agregados cuando el $\Delta\psi_m$ está intacto (fluorescencia roja), y en el citosol en forma de monómeros cuando éste se colapsa (fluorescencia verde) (Giuliani *et al.* 2009). Los datos representados en la Figura 9 muestran el cociente entre la fluorescencia en mitocondrias y en citosol (rojo/verde), normalizados con respecto al control negativo del solvente a cada tiempo, que representa la situación de mitocondria intacta (100%).

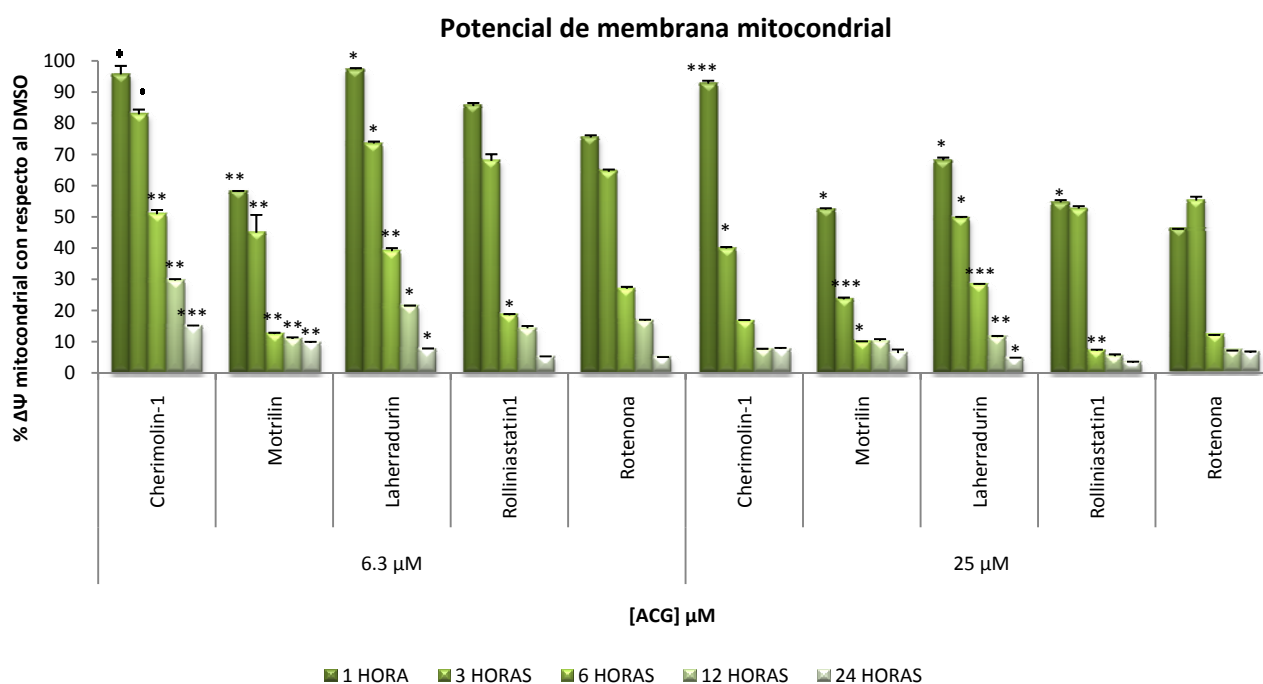


Figura 8. Efecto de las ACGs y *rotenona* sobre el $\Delta\psi_m$ en células HepG2. Los compuestos fueron ensayados a dos concentraciones (6.3 μM y 25 μM), y a varios periodos de incubación (de 1 a 24 horas). Los datos se normalizaron con referencia al solvente (DMSO/etanol) considerado como el $\Delta\psi_m$ intacto. Los asteriscos indican el nivel de significancia estadística de los datos de las ACGs en comparación con la *rotenona* ($P^* < 0.05$; $P^{**} < 0.01$; $P^{***} < 0.001$).

Como se observa en la Figura 8, a la concentración de 6.3 μM , las células tratadas durante 1 hora con *motrilin* mostraron un 40% de descenso del $\Delta\psi_m$, mientras que con el resto de compuestos el efecto fue apenas perceptible a este tiempo. En general, a las 6 horas ya se observaron efectos pronunciados con todas

las ACGs, con descensos superiores al 50%, y a tiempos más largos el colapso del $\Delta\psi_m$ fue prácticamente total.

A la concentración más alta ensayada, después de 1 hora de incubación, solo las células tratadas con *cherimolin-1* mantienen el potencial de membrana mitocondrial intacto, mientras que las células tratadas con *motrilin*, *laherradurin*, *rolliniastatin-1* y *rotenona* ya empezaron a perder su $\Delta\psi_m$, detectándose valores de entre 40 y 70% del control. Tras 6 horas de incubación, todas las células presentaron prácticamente colapsado el $\Delta\psi_m$, salvo las tratadas con *laherradurin*, que aún mantuvieron un 30%. Los valores de 12 y 24 horas de incubación a esta concentración no resultaron muy adecuados para observar diferencias entre las ACGs, debido a la alta muerte celular producida a estos tiempos.

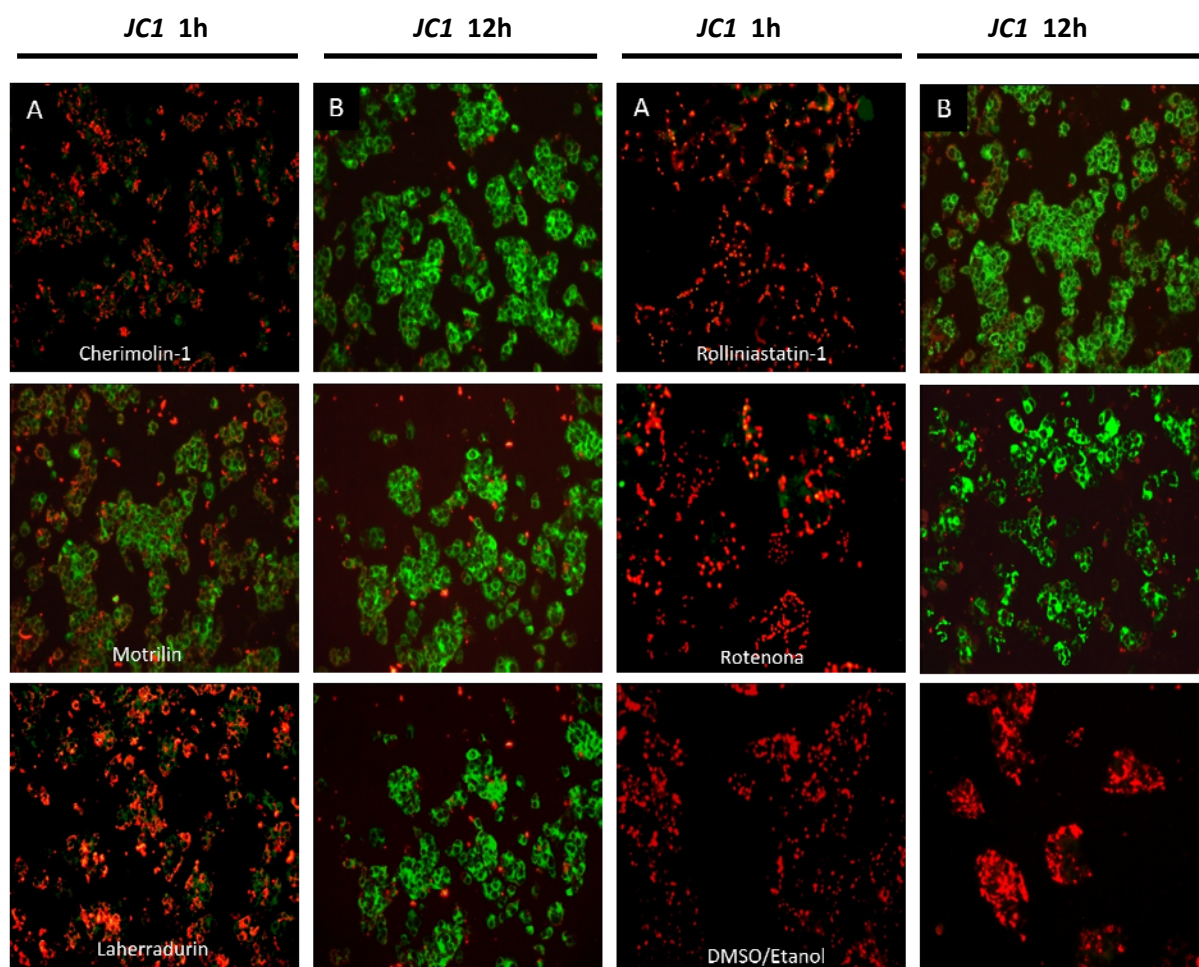


Figura 9. Efecto de las ACGs y *rotenona* sobre el $\Delta\psi_m$. Las fotografías fueron realizadas tras una incubación de 1 hora (columnas A) o 12 horas (columnas B), con una concentración de compuesto de 6.3 μ M.

La Figura 9 muestra fotografías representativas tomadas al microscopio de fluorescencia, a dos periodos de incubación, utilizando la concentración de 6.3 μM . Tras 1 hora de incubación (columnas A) se puede ver el fluorocromo *JC-1* en el interior de la mitocondria, emitiendo en rojo. Tras 12 horas de incubación (columnas B), la sonda no puede ya entrar en la mitocondria, debido a la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, por lo que permanece en el citosol en forma de monómeros, los cuales emiten en verde. En el caso de la *motrilin* se observó una marcada fluorescencia verde tras 1 hora de incubación, indicando que la pérdida del $\Delta\psi_m$ es ya observable a este tiempo.

6. IMPLICACIÓN DEL PORO DE PERMEABILIDAD TRANSITORIA MITOCONDRIAL EN LA MUERTE CELULAR MEDIADA POR ACGs

Para determinar la implicación del PPTM en la muerte celular mediada por ACGs, se realizó el ensayo de LDH en presencia de *ciclosporina A* (CYA), ya que se ha descrito que este compuesto es capaz de bloquear dicho poro (Isenberg *et al.* 2000; Li *et al.* 2010). Los datos fueron comparados con los del ensayo de LDH realizado sin bloquear el PPTM. La hipótesis de trabajo fue que si el poro mitocondrial está implicado en el mecanismo de acción de las ACGs, en presencia de CYA se debería observar una disminución en la citotoxicidad de las ACGs. Previamente se estudió el potencial efecto citotóxico de la CYA sobre las células, realizando curvas de 10 puntos (diluciones 1:2 desde 50 μM) a los mismos tiempos de incubación. A una concentración de CYA de 10 μM se observó un efecto citotóxico menor del 5%, tanto a 12 como a 24 y 48 horas (datos no mostrados).

En la Figura 10 se puede observar que al bloquear el PPTM con CYA se observa en general una disminución en la muerte celular, aunque este efecto no fue igualmente patente a todas las concentraciones y tiempos de tratamiento para todas las ACGs. Tan sólo en el caso de *laherradurin* no detectamos a ninguna de las concentraciones ni tiempos ensayados ninguna diferencia en presencia de CYA. Para *cherimolin-1* se observó una clara disminución en la muerte celular a concentraciones inferiores a 6.25 μM tras 24 o 48 horas de tratamiento, así como una leve disminución de la muerte celular en células tratadas con 25 μM durante 12 horas, pero no a las 24 y 48 horas a esta concentración. Cuando las células eran tratadas con *motrilin* durante 12 y 24 horas, pudimos ver que al bloquear el PPTM con CYA, disminuía significativamente la muerte celular a todas las concentraciones ensayadas. Este efecto se pierde sin embargo al tratar las células durante 48 horas. El tratamiento con CYA, por otro lado, sí disminuyó la muerte celular producida por *rolliniastatina-1* a todos los tiempos. En células tratadas durante 48 horas en presencia de CYA disminuyó la muerte celular a los mismos niveles que en células que habían sido tratadas 24 horas sin CYA. Finalmente, en el caso de la *rotenona*, solo detectamos cierta disminución de la muerte celular cuando las células eran tratadas durante 12 horas, aunque a este tiempo la citotoxicidad resultó baja a todas las concentraciones.

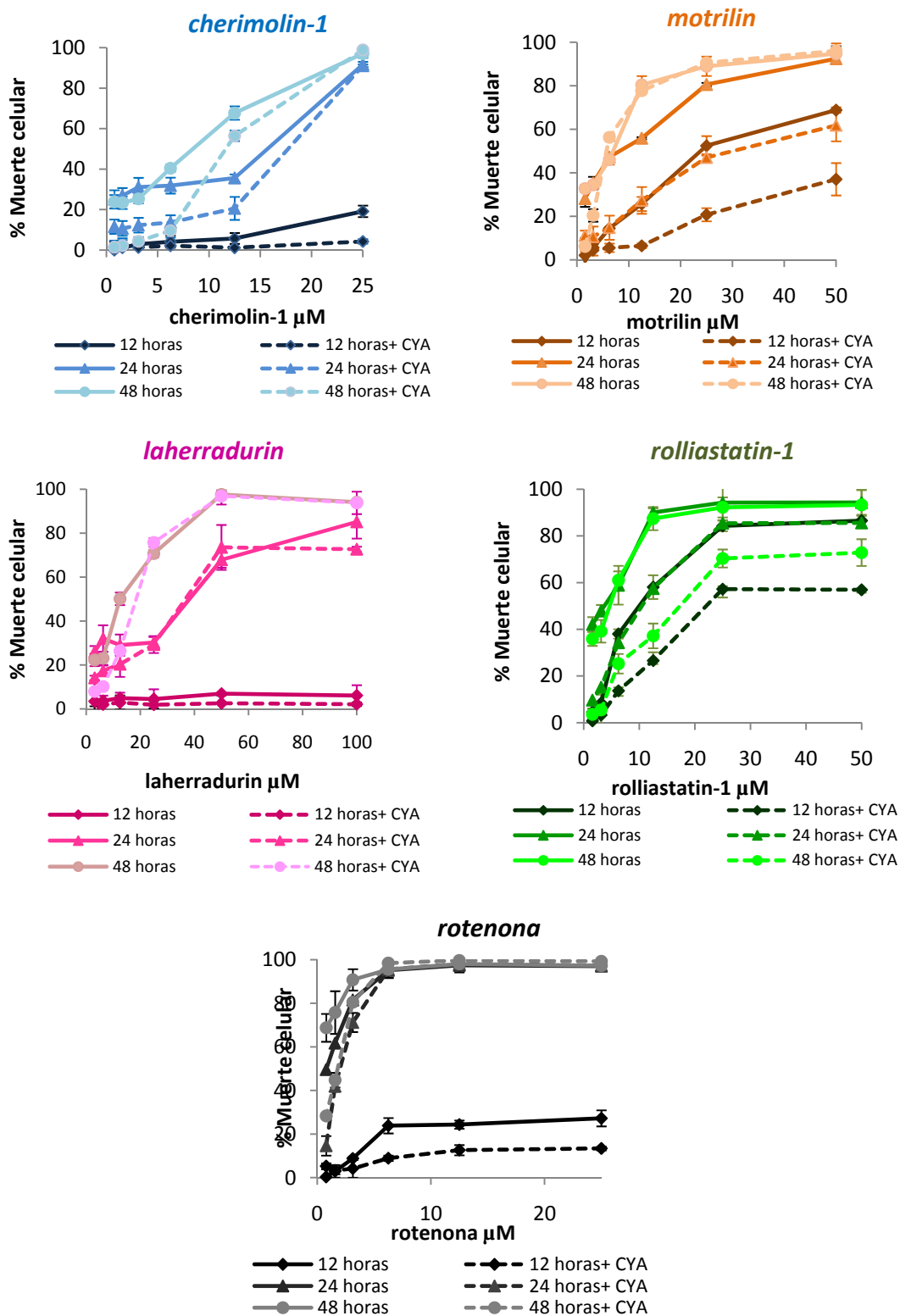


Figura 10. Curvas de citotoxicidad inducida por ACGs a distintos tiempos de incubación y concentraciones en presencia o ausencia de *ciclosporina A* (CYA).

7. FLUJO DE CALCIO CITOSÓLICO-MITOCONDRIAL EN LA APOPTOSIS

Una vez que el poro de transición está abierto como resultado de la despolarización de la membrana, el calcio mitocondrial puede salir al citosol. Para estudiar este proceso durante el tratamiento de las células con las ACGs, monitorizamos los niveles de calcio citosólico y mitocondrial usando dos sondas fluorescentes capaces de detectar específicamente el calcio en estos distintos compartimentos celulares, *Fluo-4-AM* para el calcio citosólico y *Rhod-2-AM* para el calcio mitocondrial.

A la concentración más baja ensayada y tras 3 horas de tratamiento no se observaron cambios perceptibles con ninguno de los compuestos. Sin embargo, tras el tratamiento con *cherimolin-1*, *motrilin*, *rolliniastatin-1* y *rotenona* a 25 μ M, se observa una modesta disminución en la concentración de calcio mitocondrial, en paralelo a un pequeño aumento en el calcio citosólico, de forma que el ratio calcio mitocondrial/calcio citosólico disminuye con respecto al control negativo del solvente de manera significativa (Figura 11). Sólo en el caso de *laherradurin* se obtuvieron los mismos valores que en el control negativo.

Cuando el tiempo de incubación se prolongó a 12 horas, el efecto fue sensiblemente más acusado a las dos concentraciones, tanto en los niveles de calcio mitocondrial como citosólico, lo que resulta en una profunda caída en el ratio entre ambos valores, en comparación con el control (Figura 11)

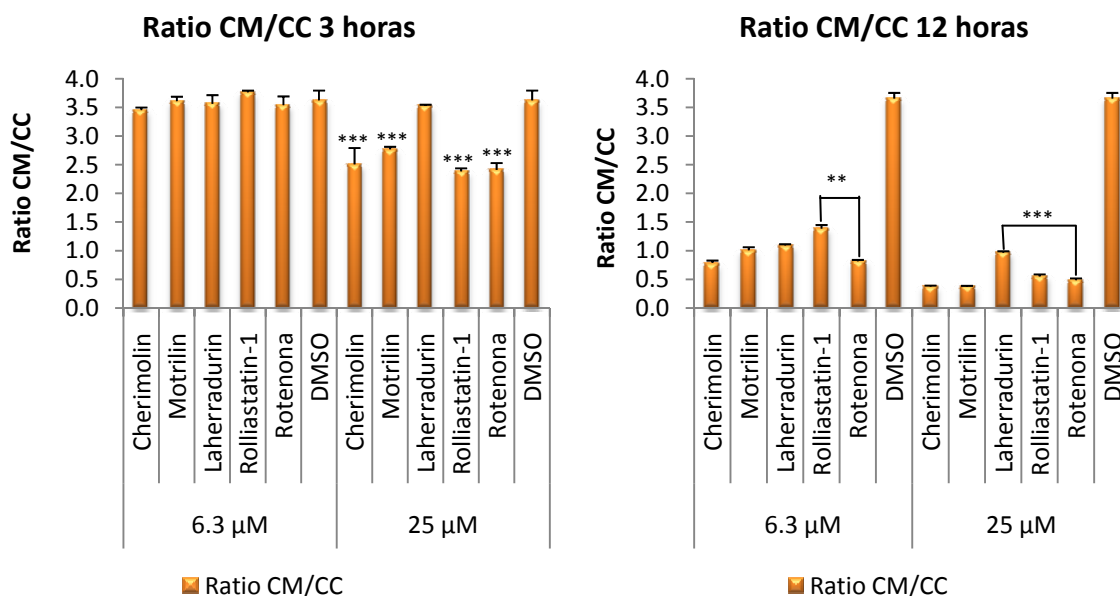


Figura 11. Determinación de los niveles de calcio mitocondrial y citosólico tras el tratamiento con ACGs y *rotenona*. Se indica el ratio entre la fluorescencia de *Rhod-2* y *Fluo-4*, como indicador del cociente CM/CC (calcio mitocondrial/calcio citosólico), a dos tiempos de incubación, 3 y 12 horas. Los asteriscos indican la significancia estadística de los datos de los compuestos en comparación con el control de solvente, en el caso de las 3 horas, y de 12 horas las ACGs y *rotenona*. ($P^* < 0.05$; $P^{**} < 0.01$; $P^{***} < 0.001$).

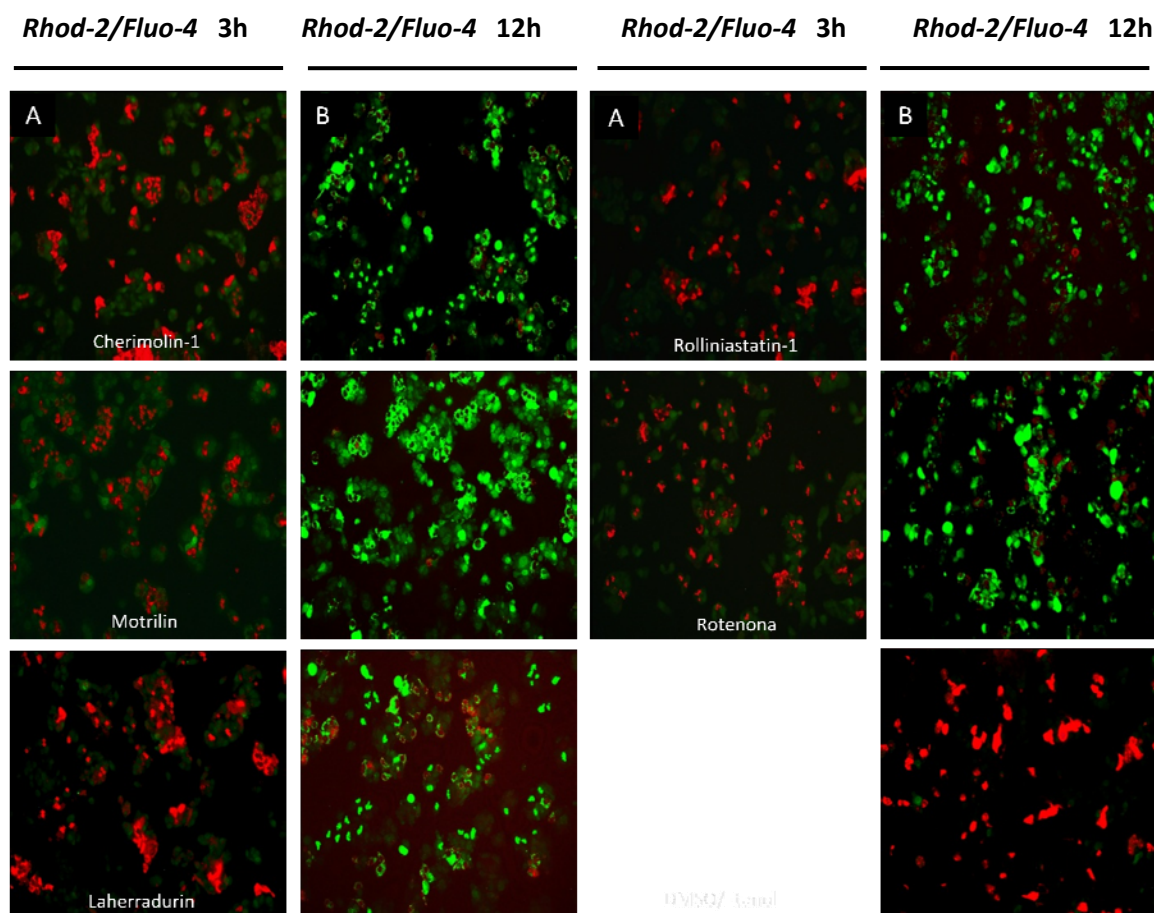


Figura 12. Fotografías obtenidas al microscopio de fluorescencia, mostrando la fluorescencia emitida por los dos fluorocromos sensibles a los niveles de calcio, *Rhod-2-AM* (rojo) y *Fluo-4-AM* (verde), tras el tratamiento de las células HepG2 con las ACGs y la *rotenona*, a una concentración de 6.3 μ M. **A.** Células tras 3 horas de incubación, la mayor parte del calcio se encuentra en las mitocondrias. **B.** Células a las 12 horas de incubación, el calcio se encuentra en el citosol, excepto en el control del solvente.

8. ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-9

Hasta ahora habíamos estudiado todas las etapas propias de la apoptosis relacionadas con la mitocondria. Pero además nos interesaba determinar qué eventos tenían lugar tras el aumento de EROs y radicales superóxidos, el colapso del potencial de la membrana mitocondrial, la apertura del poro de transición y la salida del calcio al citosol. Por ello, nuestro objetivo posterior fue evaluar la posible activación de la cadena de caspasas, un proceso característico de la apoptosis. Para ello medimos los niveles de actividad Caspasa-9 en células tratadas con ACGs o *rotenona*.

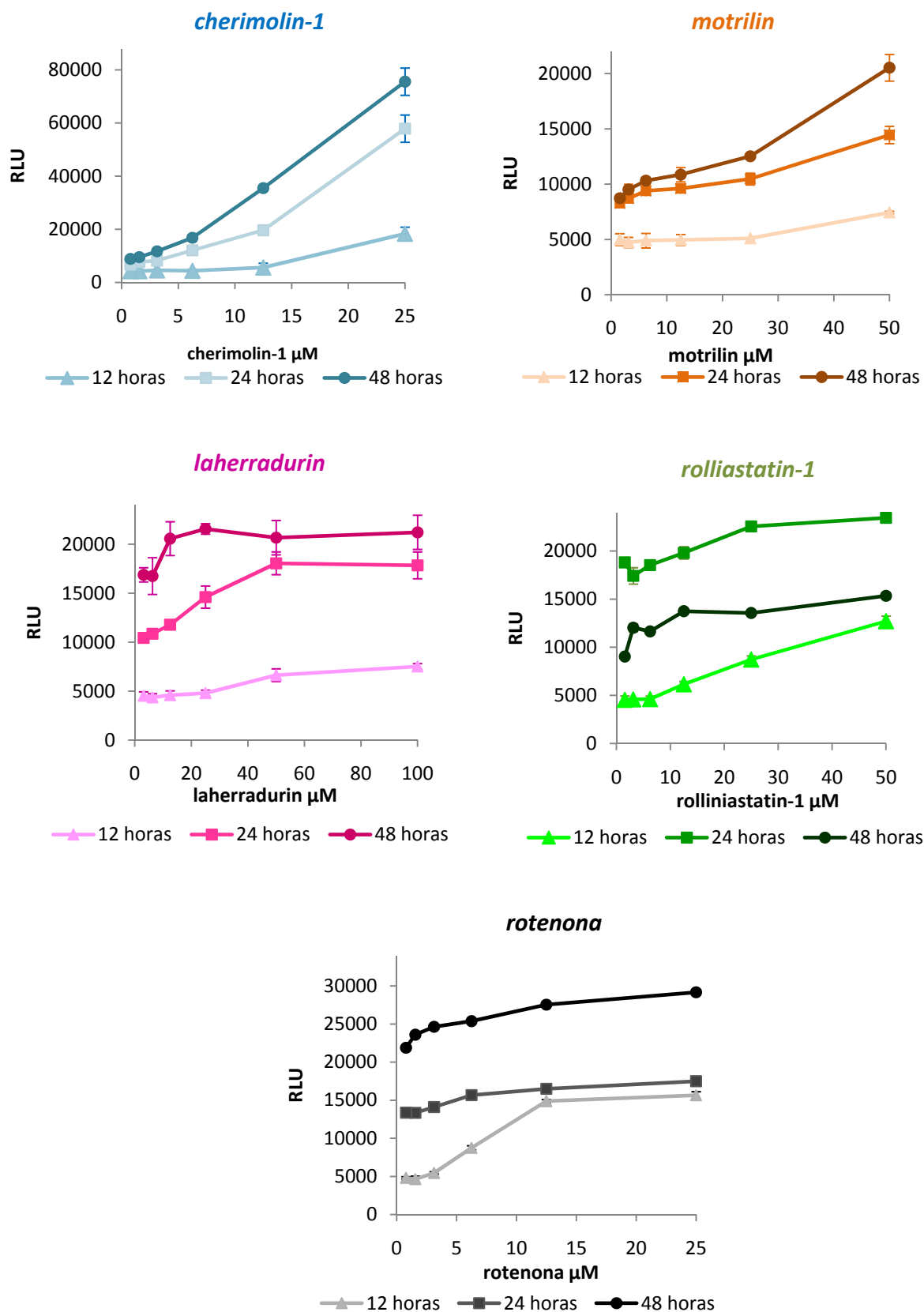


Figura 13. Inducción de la actividad de la Caspasa-9 en cultivos tratados con las ACGs y *rotenona* a varias concentraciones y a distintos tiempos de incubación (12, 24 y 48 horas). RLU (Unidades relativas de luminiscencia)

La Figura 13 muestra los niveles de actividad Caspasa-9 presente en las células tras el tratamiento con las ACGs o *rotenona* en un amplio rango de concentraciones a tres tiempos de incubación distintos. Se observa en general un aumento de la actividad Caspasa-9 dependiente de la concentración de compuesto y el tiempo de incubación. Este aumento es particularmente notable en el caso de *cherimolin-1*, como se aprecia por la distinta escala en la gráfica (4 veces superior al resto).

El efecto de los compuestos ensayados, a dos concentraciones distintas y a los tres tiempos de incubación, comparado con un control positivo como la *vinblastina*, fármaco antimitótico usado en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, se muestra en la Figura 14. Se observa que el tratamiento de las células a 24 y 48 horas con todas las ACGs y la *rotenona*, a las dos concentraciones ensayadas, induce un aumento en los niveles de actividad Caspasa-9. En contraste, a las 12 horas sólo se observó un modesto aumento de la actividad Caspasa-9 a la concentración más alta, y sólo para los casos de *cherimolin-1*, *rolliniastatin-1* y *rotenona*. El efecto fue en general muy inferior al que se observa en el control positivo de *vinblastina*, excepto para *cherimolin-1* (a 25 μ M), que tiene un efecto comparable o incluso superior, a alguno de los tiempos ensayados.

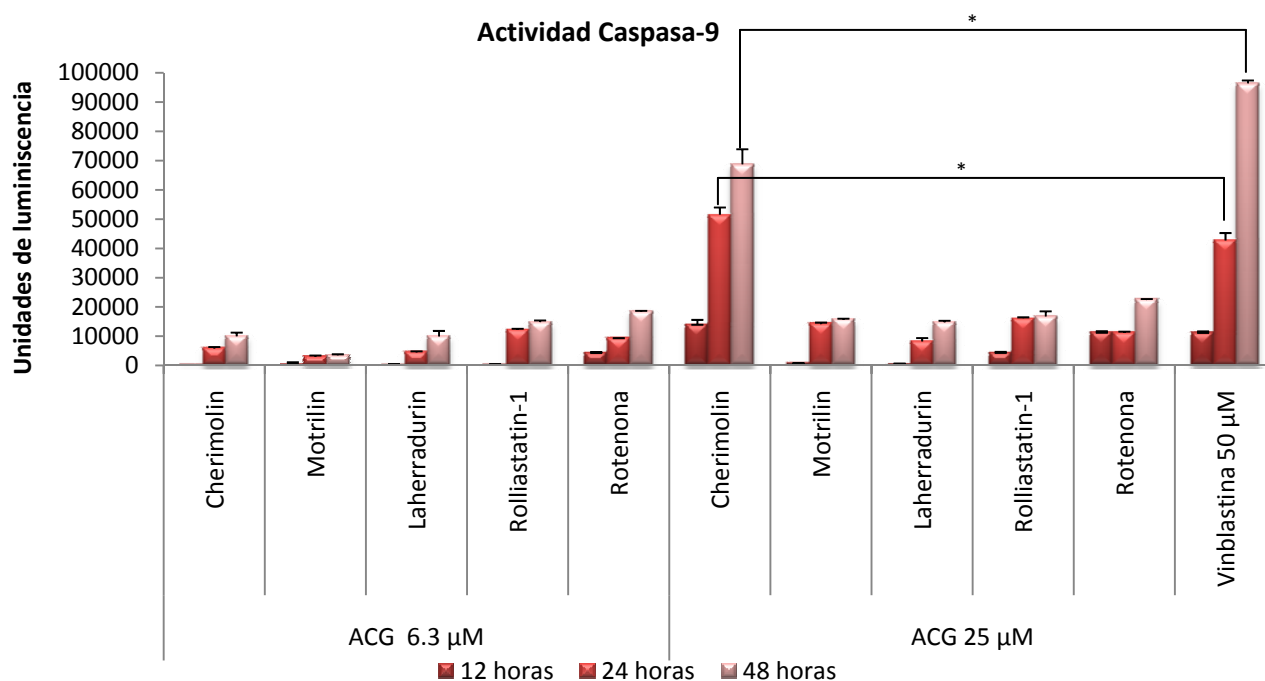


Figura 14. Inducción de la actividad de Caspasa 9 en cultivos tratados con ACGs a dos concentraciones (6.3 μ M y 25 μ M) a tres tiempos de incubación (12, 24 y 48 horas). Los asteriscos muestran la significancia estadística de los datos obtenidos para *cherimolin-1* en comparación con el control de *vinblastina* ($P^* < 0.05$; $P^{**} < 0.01$; $P^{***} < 0.001$).

9. CONDENSACIÓN DE CROMATINA, PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y MUERTE CELULAR

Las etapas posteriores en el proceso de apoptosis implican al núcleo de la célula, donde se producen fenómenos de condensación de la cromatina y fragmentación del ADN. En los últimos estadios de la apoptosis la membrana plasmática se vuelve permeable y se produce finalmente la muerte celular, en la que la membrana plasmática ha perdido su integridad. Para estudiar estos fenómenos en las células tratadas con ACGs y *rotenona* utilizamos la combinación de tres sondas fluorescentes con distintas propiedades de permeabilidad y que emiten a distinta longitud de onda (*Hoechst 33342*, *Ioduro de Propidio (PI)* y *YO-PRO-1*).

Como se observa en la Figura 15, el aumento de núcleos con cromatina condensada (*Hoechst 33342*), el aumento de la permeabilidad de la membrana (*YO-PRO-1*) y el aumento de la muerte celular (*PI*) es dependiente de tiempo de tratamiento y la concentración de compuesto. Como podría esperarse, a tiempos cortos los efectos son más pronunciados sobre la condensación de cromatina que sobre los otros dos marcadores, mientras que la señal de la sonda *PI* se incrementa de manera visible sólo a tiempos largos de incubación, especialmente a la concentración menor estudiada.

A una hora de incubación con 25 μM de ACGs se detecta sólo una discreta señal en las tres sondas estudiadas, a excepción de *rolliniastatin-1* que induce ya unos altos niveles de cromatina condensada. A las 3 horas de incubación *motrilin* también muestra mayores valores en este parámetro que el resto de las ACGs y que la *rotenona*. Tras 12 horas de incubación todos los compuestos mostraron sin embargo altos niveles de fluorescencia con las tres sondas, aunque pudimos observar un descenso significativo en los niveles de fluorescencia de la sonda *Hoechst 33342* causados por *rolliniastatin-1* y *motrilin*, en comparación con tiempos más cortos debido a la alta tasa de muerte celular que estas ACGs producen a este tiempo de incubación (Figura 2).

A la concentración de 6.3 μM , podemos observar un comportamiento similar aunque menos pronunciado, aumentando los niveles de los tres parámetros con el tiempo de incubación.

En la Figura 16 se muestran fotografías representativas de los experimentos en los que se basan los datos anteriormente señalados, donde se observa el efecto particularmente destacado tras el tratamiento con *rolliniastatin-1*.

Un resumen de los datos descritos en este trabajo para las ACGs en la cascada apoptótica se muestra en la Figura 17. El esquema indica el orden en el que se dispondrían los compuestos ensayados, según su potencia para cada etapa y el tiempo en el que se detectó actividad, a la concentración de 25 μ M.

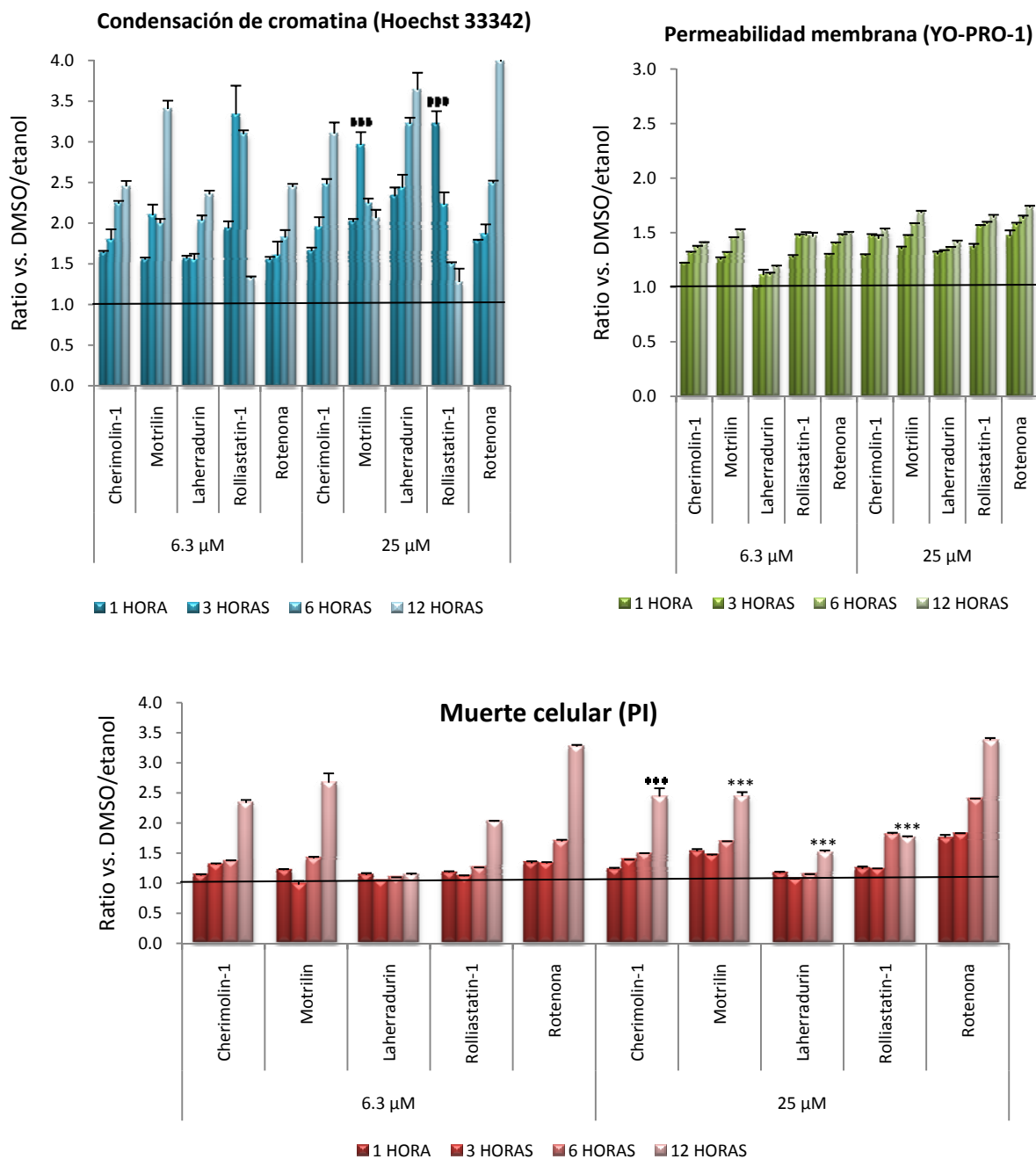


Figura 15. Niveles de fluorescencia obtenidos con tres sondas indicativas del estado de viabilidad celular (*Hoechst 33342/YO-PRO-1/PI*) en células tratadas con ACGs y *rotenona*. Los datos se expresaron como ratios con respecto al control de solvente (DMSO/etanol) considerado como la célula intacta. Los asteriscos indican el nivel de significancia estadística de los datos de las ACGs con respecto a la *rotenona* ($P^* < 0.05$; $P^{**} < 0.01$; $P^{***} < 0.001$)

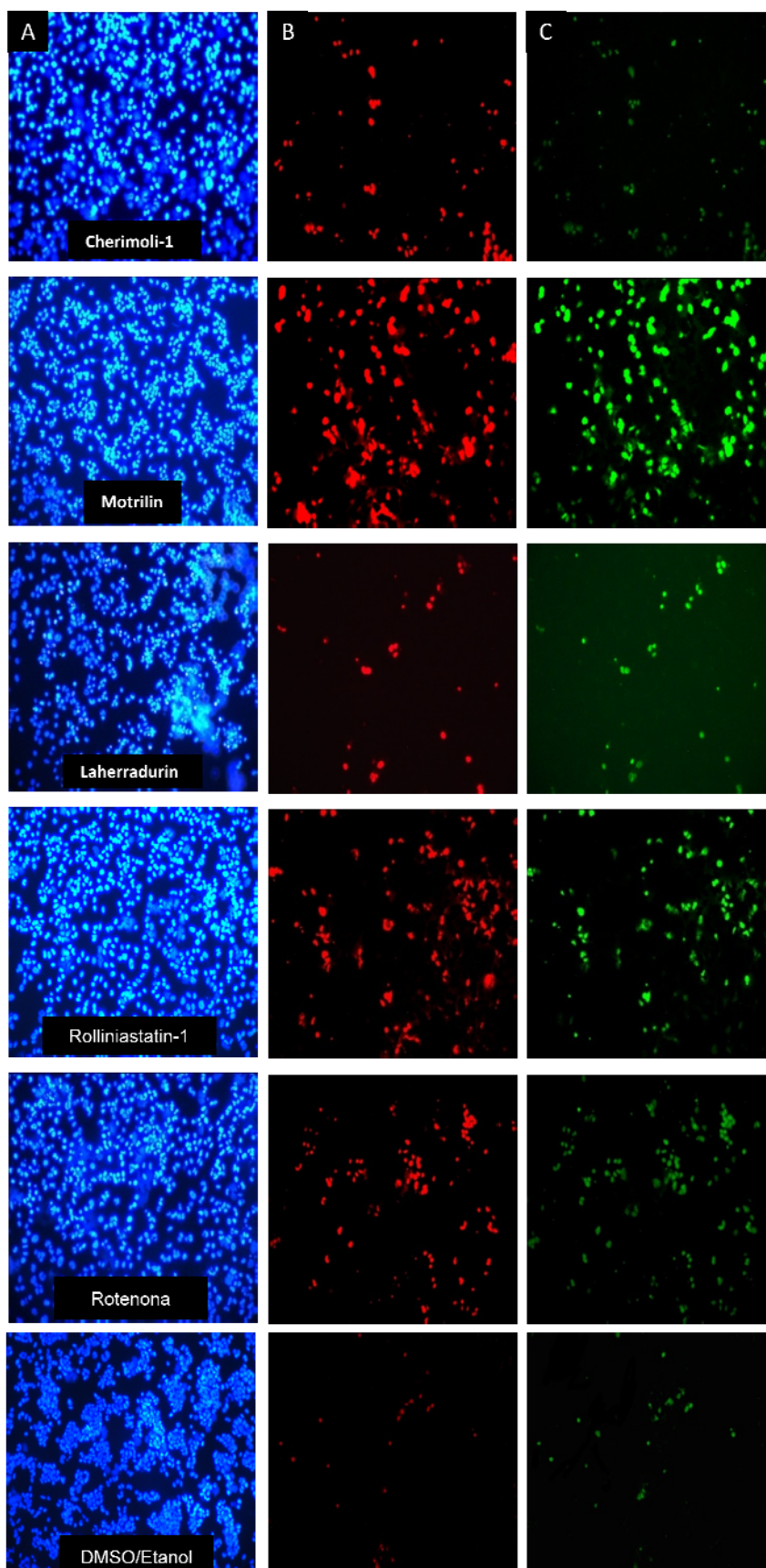


Figura 16. Respuesta de las sondas fluorescentes *Hoechst 33342* (A), *PI* (B) y *YO-PRO-1* (C) en células tratadas con *ACGs* y *rotenona*. Las fotografías están realizadas a una concentración de compuesto de 6.3 μ M, tras 6 horas de incubación.

Figura 17. Esquema resumen de las etapas de la apoptosis estudiadas. En naranja se muestran aquellas etapas para las que había datos previos sobre alguna ACG en la literatura, y en verde las que se describen por primera vez en esta tesis para estos compuestos. Se muestra el orden de potencia en cada etapa y el tiempo en el que fueron detectados estos efectos.

10. ESTUDIO DE SEGURIDAD CARDIACA

Los estudios descritos anteriormente nos permitieron caracterizar con cierto grado de detalle los eventos desencadenados por las ACGs sobre células en cultivo, indicando que estos compuestos ponen en marcha la ruta de apoptosis como resultado de la inhibición del Complejo I mitocondrial, lo cual explica su actividad citotóxica en células tumorales. Esta actividad citotóxica ha convertido a las ACGs en potenciales fármacos antitumorales, y como tales han sido estudiadas extensivamente por diversos grupos de investigación durante los últimos años (McLaughlin *et al.* 2008).

Las ACGs han sido descritas como agentes quelantes de Ca^{2+} (Liaw *et al.* 2008) y el hecho de que influyan en el flujo intracelular de este ión como hemos visto en los resultados expuestos, nos condujo al estudio de la posible interacción de estos compuestos con los canales iónicos que son fundamentales en la función cardiaca, ya que está bien documentado que la interacción de fármacos con estos canales puede tener efectos secundarios no deseables y llevar al fracaso a tales fármacos en la fases clínicas de desarrollo.

Para determinar el potencial de las ACGs para interferir con la función cardiaca se estudiaron tres tipos de canales iónicos esenciales para dicha función, el canal de potasio hERG (corriente rápida de repolarización I_{Kr}), el canal de sodio Nav1.5 (corriente de despolarización I_{Na}), y el canal de calcio de tipo L Cav1.2 (corriente de repolarización I_{Ca}).

10.1. CANAL DE SODIO Nav1.5

El canal de sodio Nav1.5 está involucrado en la fase 0 del potencial de acción, siendo el responsable de la despolarización del músculo cardiaco, iniciando dicho potencial. Para el estudio de este canal utilizamos un ensayo funcional basado en la técnica de FRET, según se describe en Materiales y Métodos (Huang *et al.* 2006), con células HEK293 que expresan de forma estable el canal Nav1.5. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Tabla 3.

Nuestros resultados indicaron que las ACGs tenían en general un efecto muy modesto sobre el canal Nav1.5, excepto *squamocin*, *aromin*, *guanaconetin-3* y *guanaconetin-4* que mostraron $\text{CI}_{50} < 10 \mu\text{M}$, próximas a algunos de los compuestos usados como control. *Gigantetronenin*, *laherradurin*, *rolliniastatin-1* e *iso-rolliniastatin-1* mostraron una débil inhibición del canal, con CI_{50} entre 20-50 μM . El resto de ACGs ensayadas tuvieron muy poco efecto o ninguno, incluso a la máxima dosis de ensayo.

Tabla 3. Efecto de las ACGs sobre el canal de sodio Nav1.5, estimado a través de un ensayo funcional basado en FRET, sobre células HEK293 que expresan de forma estable el canal de sodio Nav1.5. Se indican las CI_{50} de las ACGs y de varios compuestos de control (*tetrodotoxina*, *riluzol* y *tetracaina*), obtenidas a partir de curvas dosis-respuesta.

Compuestos	Nav1.5 CI_{50} (μ M)
<i>laherradurin</i>	32 ± 6
<i>almuñequin</i>	>50(30%)
<i>aromin</i>	4.4 ± 1.2
<i>cherimolin-1</i>	>50 (0%)
<i>guanaconetin-1</i>	>50 (49%)
<i>guanaconetin-3</i>	6.9 ± 2.4
<i>guanaconetin-4</i>	9.6 ± 2.3
<i>motrilin</i>	>50
<i>rolliniastatin-1</i>	33 ± 7
<i>squamocin</i>	2.4 ± 0.8
<i>iso-rolliastatin-1</i>	36 ± 4
<i>annonacin</i>	>50 (40%)
<i>annonacin-A</i>	>50 (11%)
<i>annonacinona</i>	>50(27%)
<i>densicomacin</i>	>50 (0%)
<i>gigantetronenin</i>	22 ± 3
<i>iso-annonacin</i>	>50 (10%)
<i>iso-annonacinona</i>	>50 (5%)
<i>rotenona</i>	>50 (35%)
<i>tetrodotoxina</i>	1.25 ± 0.9
<i>riluzol</i>	0.68 ± 0.2
<i>tetracaina</i>	$2.65 \quad 1.2$

10.2. CANAL DE CALCIO Cav1.2

El canal de calcio tipo L es el responsable de la duración de la fase de meseta del potencial de acción y de la regulación de la contractibilidad cardiaca. Para el estudio de la influencia de las ACGs en el canal de calcio Cav1.2 utilizamos un ensayo funcional basado en una sonda fluorescente sensible a la concentración de iones Ca^{2+} (*Fluo-4-AM*). El ensayo se realizó en dos condiciones distintas de potencial de membrana, ya que se sabe que los bloqueantes del canal Cav1.2 son dependientes del estado del canal, que puede estar en reposo (-75 mV) o semi-despolarizado (-35 mV) (Xia *et al.* 2004).

Como se puede apreciar en la Tabla 4, estas diferencias pueden ser de hasta un orden de magnitud en algunos casos (e.g., *nicardipina*, *nimodipina*, *nitrendipina* o *metoxiverapamilo*).

Sin embargo, los resultados del ensayo funcional con las cuatro ACGs seleccionadas fueron muy poco concluyentes, no obteniéndose curvas dosis-respuesta interpretables, sino una inhibición parcial de la señal de forma no-dependiente de la concentración de compuesto (Figura 18). La *rotenona* se comportó de forma similar. Muy posiblemente ello sea debido al flujo de calcio intrínseco entre mitocondrias, citosol y retículo endoplasmático, que tiene lugar como parte del proceso de apoptosis inducido por estos compuestos (ver sección 8), el cual interfiere con este ensayo, haciendo imposible medir con precisión el flujo de calcio a través del canal Cav1.2 al citoplasma.

En el caso de *rolliniastatin-1* se realizó una curva de 10 puntos (diluciones 1:2) para comprobar la respuesta a concentraciones inferiores a las mostradas en la Figura 18, pero los resultados obtenidos (datos no mostrados) fueron igualmente inconcluyentes (42% de inhibición a una concentración de 24.4 nM).

Tabla 4. Efecto de varios estándares comerciales sobre el canal de calcio de tipo L, estimado a través de un ensayo funcional sobre células HEK294 que expresan de forma estable el canal de calcio Cav1.2. El ensayo se realizó en dos condiciones de potencial de membrana. Se indican las CI_{50} obtenidas a partir de curvas dosis-respuesta.

Compuestos	Condiciones de reposo (-75 mV) CI_{50} (nM) \pm Stdv	Condiciones de semi-despolarización (-35 mV) CI_{50} (nM) \pm Stdv
<i>diltiazem</i>	5635 \pm 512	2191 \pm 98
<i>isradipina</i>	6.7 \pm 1.2	1.3 \pm 0.6
<i>nicardipina</i>	34 \pm 5	1.3 \pm 0.3
<i>nifedipina</i>	33 \pm 4	9.9 \pm 1.5
<i>nimodipina</i>	14 \pm 2	1.4 \pm 0.8
<i>nitrendipina</i>	33 \pm 12	3.6 \pm 1.1
<i>metoxiverapamilo</i>	1790 \pm 164	160 \pm 32
<i>verapamilo</i>	2610 \pm 198	885 \pm 64

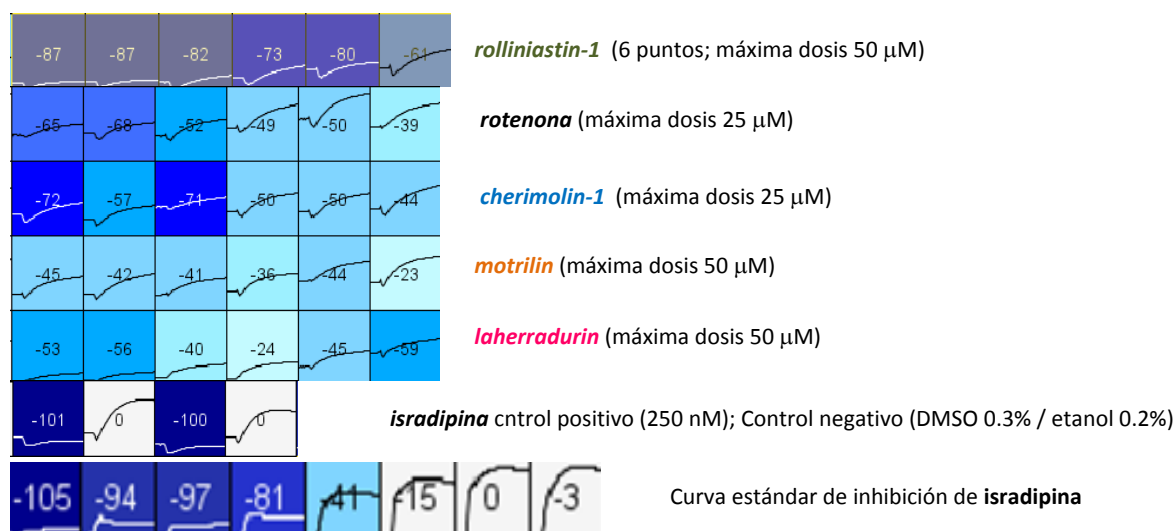


Figura 18. Representación del flujo de iones calcio al citosol en células HEK293 que expresan de forma estable el canal Cav1.2 tratadas con distintas concentraciones de ACGs y *rotenona*.

Ante la falta de resultados definidos, decidimos realizar un estudio más específico de la posible interacción de las ACGs con el canal de calcio a través de ensayos de unión receptor-ligando. Se sabe que este canal tiene al menos tres sitios distintos de unión a fármacos (Glossmann *et al.* 1983; Bean *et al.* 1984; Garcia *et al.* 1984), por lo que se pusieron a punto otros tantos ensayos, utilizando ligandos marcados específicos de cada sitio de unión, según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 5.

En líneas generales, todas las ACGs ensayadas mostraron una moderada afinidad por el canal de calcio, compitiendo con los ligandos seleccionados por su unión a los tres distintos sitios del canal, con Cl_{50} en el rango micromolar. *Guanaconetin-3* y *guanoconetin-4* incluso mostraron Cl_{50} por debajo de 1 µM en el sitio de unión a benzotiazepinas. Las únicas excepciones fueron la *laherradurin*, que no mostró afinidad por el sitio de unión a benzotiazepinas a las concentraciones de ensayo (aunque sí mostró afinidad por los otros dos sitios de unión) y *almuñequin*, que no mostró afinidad por el sitio de unión de dihidropiridinas.

No se observó una selectividad muy marcada de estos compuestos por ninguno de los sitios de unión a ligandos, aunque en general las Cl_{50} fueron algo superiores en el ensayo de desplazamiento de [3H]-*nitrendipina* (sitio de unión de dihidropiridinas)

Tabla 5. Efecto de las ACGs sobre el canal de Cav1.2, estimado a través de su capacidad de desplazar ligandos marcados específicos para los tres sitios de unión a ligandos caracterizados para este canal.

Compuestos	Sitio de unión a benzotiazepinas CI ₅₀ (μM) ± Stdv	Sitio de unión a dihidropiridinas CI ₅₀ (μM) ± Stdv	Sitio de unión a fenilalquilaminas CI ₅₀ (μM) ± Stdv
<i>laherradurin</i>	>50 (26%)	4.3 ± 0.1	2.5 ± 0.1
<i>almuñequin</i>	26 ± 14	>50	7.8 ± 1.3
<i>aromin</i>	1.9 ± 0.2	3.7 ± 0.3	2.0 ± 0.3
<i>cherimolin-1</i>	4.3 ± 0.9	26 ± 7	2.7 ± 0.4
<i>guanaconetin-1</i>	1.1 ± 0.6	1.8 ± 0.3	1.2 ± 0.1
<i>guanaconetin-3</i>	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1
<i>guanaconetin-4</i>	0.1 ± 0.03	1.8 ± 0.3	1.1 ± 0.1
<i>motrilin</i>	2.6 ± 0.6	11 ± 2	2.6 ± 0.5
<i>rolliniastatin-1</i>	1.6 ± 0.3	3.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1
<i>squamocin</i>	1.4 ± 0.3	2.8 ± 0.4	1.1 ± 0.1
<i>iso-rolliastatin-1</i>	24 ± 9	3.5 ± 0.9	3.7 ± 0.3
<i>annonacin</i>	2.8 ± 0.1	4.0 ± 0.5	1.9 ± 0.1
<i>annonacin-A</i>	1.8 ± 0.8	6.8 ± 0.3	3.2 ± 0.1
<i>annonacinona</i>	2.9 ± 1.9	8.8 ± 0.5	4.2 ± 0.2
<i>densicomacin</i>	20 ± 1	33 ± 5	8.0 ± 1.3
<i>gigantetronenin</i>	1.6 ± 0.2	6.6 ± 0.6	2.8 ± 0.3
<i>iso-annonacin</i>	2.2 ± 0.9	12 ± 4	3.1 ± 0.4
<i>iso-annonacinona</i>	3.5 ± 0.6	12 ± 4	2.8 ± 0.1
<i>isradipina</i>	5.4 ± 1.2	0.05 ± 0.01	0.01 ± 0
<i>felodipina</i>	2.2 ± 0.8	0.08 ± 0.02	0.02 ± 0
<i>nicardipina</i>	0.58 ± 0.15	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0
<i>nifedipina</i>	>20 (12%)	0.20 ± 0.01	0.10 ± 0.02
<i>nimodipina</i>	5.2 ± 1.1	0.12 ± 0.02	0.08 ± 0.02
<i>nitrendipina</i>	>20(22%)	0.18 ± 0.03	0.08 ± 0.01
<i>diltiazem</i>	0.17 ± 0.02	>20(16%)	0.3 ± 0.1
<i>metoxiverapamilo</i>	0.04 ± 0.01	>20(17%)	0.02 ± 0.01
<i>verapamilo</i>	0.11 ± 0.01	>20(21%)	0.03 ± 0.01

10.3. CANAL DEL POTASIO hERG

El canal de potasio hERG es el responsable de la repolarización y de la duración del potencial de acción. El efecto potencial de las ACGs sobre el canal de potasio hERG fue estudiado en primera instancia mediante un ensayo de unión receptor-ligando, donde estudiábamos si las ACGs eran capaces de desplazar a un ligando bloqueante específico de este canal, el ³⁵S-MK499 (Raab *et al.* 2005). Los resultados de estos ensayos,

realizados con las 18 ACGs disponibles en este trabajo, se muestran en la Tabla 6. Los datos indicaban que la mayoría de las ACGs eran capaces de desplazar al *MK499* con unas $CI_{50} < 3 \mu M$, excepto *guanoconetin-3*, *densicomacin* e *iso-anonacinona*, con CI_{50} entre 5-15 μM , y *almuñequin* e *iso-rolliniastatin-1* con $CI_{50} \approx 30 \mu M$. Únicamente *rolliniastatin-1* no mostró afinidad aparente por este canal a las concentraciones ensayadas. Estos datos hacían sospechar de una posible interferencia de estos compuestos sobre la actividad del canal hERG, pero considerando que no siempre la unión de un compuesto al canal en ensayos receptor-ligando afecta a la funcionalidad del mismo, decidimos confirmar estos datos mediante un ensayo funcional con células HEK293 que expresan de forma estable el canal hERG, lo cual nos permitiría establecer si dicha interacción realmente afectaba al flujo de iones a través de dicho canal. Los resultados de estos experimentos, realizados con las cuatro ACGs seleccionadas para los estudios de apoptosis descritos anteriormente, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 6. Efecto de las ACGs sobre el canal hERG, estimado mediante su capacidad de desplazar la unión del ligando [^{35}S]-*MK499* a membranas de células HEK293 que expresan de forma estable el canal hERG. Se indican las CI_{50} de las ACGs, obtenidas a partir de curvas dosis-respuesta. Como control positivo se utilizó el *astemizol*.

Compuestos	hERG CI_{50} (μM)
<i>laherradurin</i>	0.91 ± 0.22
<i>almuñequin</i>	29 ± 4
<i>aromin</i>	0.8 ± 0.2
<i>cherimolin-1</i>	1.8 ± 0.5
<i>guanaconetin-1</i>	2.1 ± 0.2
<i>guanaconetin-3</i>	8.7 ± 0.3
<i>guanaconetin-4</i>	1.1 ± 0.3
<i>motrilin</i>	3.0 ± 0.3
<i>rolliniastatin-1</i>	>50 (40%)
<i>squamocin</i>	0.64 ± 0.21
<i>iso-rolliniastatin-1</i>	32 ± 7
<i>annonacin</i>	0.55 ± 0.12
<i>annonacin-A</i>	1.1 ± 0.3
<i>annonacinona</i>	1.9 ± 0.6
<i>densicomacin</i>	9.2 ± 4.1
<i>gigantetronenin</i>	0.9 ± 0.3
<i>iso-annonacin</i>	2.6 ± 0.6
<i>Iso-annonacinona</i>	14 ± 6
<i>astemizol</i>	1.34 ± 0.21

Tabla 7. Efecto de las ACGs sobre el canal hERG estimado mediante un ensayo funcional sobre células HEK293 que expresan de forma estable el canal de potasio hERG. Se indican las CI_{50} de las ACGs y varios compuestos de control, obtenidas a partir de curvas dosis-respuesta.

Compuestos	hERG CI_{50} (μM)
<i>cherimolin-1</i>	>25 (22%)*
<i>motrilin</i>	>50 (15%)*
<i>laherradurin</i>	>100 (18%)*
<i>rolliniastatin-1</i>	>50 (12%)*
<i>rotenona</i>	41 ± 3
<i>amiodarona</i>	1.7 ± 0.1
<i>astemizol</i>	0.01 ± 0.01
<i>bepridil</i>	0.42 ± 0.05
<i>haloperidol</i>	0.23 ± 0.01
<i>imipramina</i>	0.01 ± 0.01
<i>terfenadina</i>	0.33 ± 0.02

* % de inhibición a la dosis máxima ensayada

1. LAS ACGs COMO INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE LINEAS TUMORALES HUMANAS

En el ámbito de la quimioterapia contra el cáncer el 67% de los medicamentos utilizados en la clínica son de origen natural (Cragg *et al.* 2002; 2005; 2009). La mayoría de los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento del cáncer son caros, tóxicos y poco eficaces en el tratamiento de la enfermedad, debido, en parte, debido a la aparición de multiresistencias. La falta de nuevos fármacos antitumorales sugiere que es necesario explorar en profundidad todas las alternativas posibles, incluyendo los agentes procedentes de fuentes naturales.

Los avances en el estudio del cáncer ocurridos en las últimas décadas han permitido la identificación de numerosas dianas para la búsqueda de nuevos tratamientos (recientemente oncogenes o genes supresores de tumores, tales como bcr-abl, c-kit, EGFR, PI3K, Ras, B-Raf, p53, PTEN, Rb, p16^{INK4a}, etc.). Una de las dianas que ha sido propuesta para la búsqueda de nuevos fármacos antitumorales es la mitocondria (Fulda *et al.* 2010), debido principalmente a su papel principal en la apoptosis y por ser la fuente esencial de energía para la célula. Considerando su papel en la regulación de funciones celulares fundamentales, no es sorprendente que la mitocondria esté implicada en múltiples aspectos de la generación y progresión de tumores. Mutaciones en el DNA de la mitocondria que afecten a la CTE pueden resultar en una ineficiente producción de ATP, en la sobreproducción de EROs y en estrés oxidativo que afectaría a la mitocondria y a múltiples macromoléculas. Ciertos polimorfismos y mutaciones en el DNA mitocondrial correlacionan con un incremento en el riesgo de desarrollar tumores de mama, próstata y tiroides, entre otros. Por esta razón, los fármacos que actúan directamente sobre la mitocondria han sido y son, en la actualidad, foco de numerosos estudios (*e.g. obatoclax, dicloroacetato, menadiona y resveratrol*) (Fulda *et al.* 2010).

Las ACGs, como productos naturales con un interesante potencial farmacológico, han mostrado un potente efecto citotóxico frente a líneas celulares tumorales, aunque se desconoce en detalle tanto su mecanismo de acción como los factores que modulan su efectividad contra las células cancerosas. Diversas dianas han sido propuestas como posibles causantes de la muerte celular inducida por las ACGs. Estos compuestos han sido descritos principalmente como potentes inhibidores del Complejo I de la CTE; también se ha descrito que inhiben la ubiquinona unida a la NADH oxidasa que se encuentra constitutivamente expresada en la membrana celular de las células cancerosas, pero sólo transitoriamente en células no tumorales (Alali *et al.* 1999; Morré *et al.* 1995). Además se ha descrito que *annonacin* debe parte de su citotoxicidad a su acción sobre la Topoisomerasa I (Lopez *et al.* 2001),

deteniendo las células T24 en la fase G1 del ciclo celular (Yuan *et al.* 2001). Igualmente, se ha publicado que *squamocin* induce apoptosis mediada por Bax y por Caspasa-3 (Xiao-Feng *et al.* 2001).

En el presente estudio se ha evaluado inicialmente la sensibilidad de seis líneas celulares tumorales y dos líneas no tumorales al tratamiento con 18 ACGs que abarcaban diferentes tipos estructurales. Aún no detectando una correlación clara entre estructura química y actividad biológica en el ensayo de citotoxicidad, pudimos observar algunos patrones comunes para ACGs de estructura química afín. Por ejemplo, en el caso de la única representante de las 'iso' ACGs bis-tetrahidrofuránicas adyacentes con γ -lactona saturada, *iso-rolliniastatin-1*, observamos valores de citotoxicidad muy similares a los de su correspondiente ACG sin translactonizar, *rolliniastatin-1*, aunque destaca una acusada disminución de la citotoxicidad sobre la línea celular sana de pulmón (CCD 16 Lu) para la forma 'iso'. Este mismo efecto lo encontramos en las ACGs mono-tetrahidrofuránicas con γ -lactona saturada tipo 'iso', *iso-annonacin* e *iso-annonacinona*, frente a sus formas no translactonizadas *annonacin* y *annonacinona*. Por otro lado es de resaltar que *laherradurin*, la única ACG bis-tetrahidrofuránica adyacente con γ -lactona saturada β -hidroxilada de este estudio, no mostró citotoxicidad frente a las dos líneas no tumorales utilizadas, lo cual sería una característica positiva de cara a su evaluación como fármaco antitumoral.

En líneas generales, la mayoría de las ACGs ensayadas mostraron en este ensayo una potencia superior (o como mínimo semejante) a estándares como la *doxorubicina* o la *actinomicina D*, y al igual que estos compuestos, mostraron escasa selectividad por las líneas tumorales frente a las no tumorales (aunque con frecuencia la línea no tumoral CCD 16 LU fue menos sensible que el resto de líneas ensayadas). En la línea MES-SA de cáncer de útero y en su derivada multiresistente a diversos fármacos (MES-SA/Dx5) la mayoría de las ACGs mostraron DE_{50} similares. En el caso de *rolliniastatin-1* encontramos incluso una mucha mayor citotoxicidad sobre MES-SA/Dx5 que sobre la línea MES-SA, sobre la que no observamos aparente toxicidad. Un efecto similar ha sido descrito en células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) y su derivada multiresistente (MCF-7/Adr) al tratarlas con *rolliniastatin-2* (*bullatacin*), compuesto que actuaba como citostático sobre la línea celular MCF-7 y como citotóxico frente a MCF-7/Adr (McLaughlin *et al.* 2008). Estos resultados, junto con los obtenidos en la presente tesis, demuestran la potente actividad citotóxica de las ACGs sobre líneas tumorales resistentes a fármacos, lo cual representa un factor de indudable interés de cara a su potencial desarrollo como agentes de uso terapéutico.

Con los resultados obtenidos en el ensayo de MTT pudimos confirmar la citotoxicidad producida por las ACGs, pero este tipo de ensayo nos limitaba el estudio en detalle de la citotoxicidad originada por estos compuestos, ya que, debido al elevado tiempo de incubación con el sustrato (MTT), sólo podíamos

hacer estudios a tiempos largos, limitando uno de los objetivos de la presente tesis, el detectar posibles diferencias en el comportamiento de las ACGs, no solo en cuanto a potencia frente a las líneas celulares, sino también en su actividad y efectos a lo largo del tiempo. Para poder detectarlo llevamos a cabo un ensayo alternativo que evaluaba la citotoxicidad basándose en la medición de la actividad LDH, lo cual nos permitió estudios cinéticos desde tiempos cortos, indicando qué condiciones de ensayo serían las óptimas para realizar los estudios de apoptosis. Este ensayo puso de manifiesto el distinto comportamiento de la ACGs con respecto al periodo necesario para inducir la citotoxicidad, generando información imprescindible para poder evaluar las respuestas apoptóticas originadas por el tratamiento de las ACGs a los tiempos adecuados para cada una. Para estos estudios decidimos utilizar células HepG2, las cuales habían mostrado una sensibilidad notable frente a estos compuestos, permitiéndonos estudiar los posibles mecanismos de apoptosis mediados por estos inhibidores del Complejo I, diseccionando la vía por la cual originan la muerte celular, propósito principal de la presente tesis.

Para llevar a cabo los estudios detallados de la apoptosis mediada por las ACGs, elegimos un subconjunto de estos compuestos, seleccionando diferentes representantes que interaccionan con los distintos sitios de unión del Complejo I (Tormo *et al.* 1999; 2001). Así, seleccionamos una ACG que se une al sitio de unión A (*cherimolin-1*), dos que se unen al sitio más común de unión B (*motrilin* y *laherradurin*), las cuales presentaban distinta potencia en el ensayo de MTT y pertenecían a distintas familias estructurales, y por último una que se une a ambos sitios A y B (*rolliniastatin-1*).

Aunque los tratamientos con todas las ACGs a tiempos de 24 y 48 horas producían aproximadamente el 100% de muerte celular, no todas ellas llegaron a este punto de la misma manera. En el caso de *motrilin* y *rolliniastatin-1* el grado de muerte celular creció de manera aproximadamente lineal desde la primera hora de tratamiento para concentraciones superiores a 6 μM . Por contra, la *rotenona* apenas se observó muerte celular en tratamientos de hasta 6 horas, ni siquiera a la concentración máxima ensayada, pero a partir de las 12 horas se produjo un aumento muy significativo de esta. El caso de *cherimolin-1* y *laherradurin* fue similar a este, detectándose niveles mínimos de muerte celular hasta las 12 horas, y un aumento muy acusado a las 24 horas.

Todas las ACGs mostraron en los ensayos de citotoxicidad DE_{50} en el rango de μM , mientras que en los ensayos como inhibidores del complejo I mostraban actividad en el rango de nM (Tormo *et al.* 1999; 2000). Una posible explicación a esta diferencia de potencia, podría ser que los ensayos sobre el Complejo I son llevados a cabo en partículas submitocondriales, por lo que las ACGs no encontrarían ninguna barrera física para acceder al sitio de unión del Complejo I. En contraste, en los ensayos de

citotoxicidad tienen que atravesar las membranas plasmática y mitocondrial, y además el transporte y el metabolismo celular podría afectar a la citotoxicidad de las ACGs (Schlie-Guzmán *et al.* 2009). Otra posible explicación a esta diferencia de potencia entre inhibición del Complejo I y muerte celular, puede estar en las diferencias tanto en el órgano de origen de la línea celular como en el propio organismo. Las partículas submitocondriales utilizadas para medir la inhibición del Complejo I fueron de corazón de ternera, mientras que los estudios de citotoxicidad se han realizado en líneas celulares humanas. Esta última hipótesis estaría apoyada por un estudio en el que se midió inhibición del Complejo I en partículas submitocondriales de cerebro y en paralelo la inducción de muerte celular en neuronas, observándose que la respuesta en ambos casos era del mismo orden de magnitud (Höllerhage *et al.* 2009).

Además, la distinta polaridad de las diferentes ACGs, evidenciada por su diversidad estructural, afectaría de forma diferencial a su capacidad para atravesar la membrana plasmática (Schlie-Guzmán *et al.* 2009). Esto también podría hacerlas comportarse de distinta manera en el interior celular y, en concreto en el acceso al Complejo I, lo que podría explicar las diferencias que se observan en los distintos tiempos a los cuales producen la muerte celular. Es de destacar en este sentido la escasa correlación existente entre la potencia de estos compuestos como inhibidores del Complejo I y su actividad citotóxica. Por ejemplo, *cherimolin*, que es 10 veces menos potente que *laherraudirin* como inhibidor del Complejo I, presentaba en general una actividad citotóxica más potente, y de manera particularmente notable sobre la línea HepG2, donde mostró una $DE_{50} \approx 60$ veces menor. *Laherradurin* pese a ser el inhibidor más potente del Complejo I, resultó ser la más lenta en ocasionar muerte celular, que sólo se pudo observar tras 24 horas de incubación. Sin embargo *rolliniastatin-1*, que muestra una potencia menor como inhibidor del Complejo I, produjo muerte celular claramente observable tras sólo 1 hora de tratamiento, a las mismas dosis.

2. INDUCCION DE APOPTOSIS GENERADA POR LAS ACETOGENINAS

En la presente tesis doctoral hemos intentado por estudiar en profundidad una de las vías que han sido descritas como posible origen de la capacidad de las ACGs de ocasionar muerte celular en líneas tumorales, derivada de su potente actividad como inhibidores del Complejo I mitocondrial.

Se ha descrito que la citotoxicidad mediada por *rotenona* se debe a su interacción directa con el Complejo I de la CTE (Betartet *et al.* 2000; Greenmyre *et al.* 2001; Sherer *et al.* 2003; Greenmyre *et al.* 2003). La *rotenona* se une a la enzima en el punto de mayor potencial de los centros Fe-S, antes del

coenzima Q (Ramsay *et al.* 1991). Dicha interacción induce la pérdida de los electrones que debían ser transportados desde el NADH a la ubiquinona en su lugar de reducción (Hensley *et al.* 1998; Kushnareva *et al.* 2002). De forma similar, se ha descrito la interacción directa de las ACGs con el Complejo I de la CTE en distintos sitios de unión (Tormo *et al.* 1999). En el presente estudio demostramos que la interacción de las ACG con el Complejo I desencadena la vía mitocondrial de apoptosis que anteriormente había sido descrita para la *rotenona*.

Tras la inhibición del Complejo I por la *rotenona*, la concentración de ATP celular desciende considerablemente, comprometiendo el estado bioenergético de la célula (Shamoto-Nagai *et al.* 2003). Este efecto, que también nosotros pudimos observar al tratar las células HepG2 con *rotenona*, lo detectamos igualmente en el tratamiento con las ACGs, a niveles en los que se observa únicamente $\approx 10\%$ de muerte celular. Esta comparación se pudo llevar a cabo al realizar el estudio a diferentes tiempos, necesarios dada la distinta actividad mostrada por las ACGs. En estas condiciones pudimos observar una disminución en el ATP celular de aproximadamente un 30-35% tanto para las células hepáticas tratadas con ACGs como para la *rotenona*. El descenso de ATP en otros tipos de células tratadas con algunas ACGs había sido estudiado ya con anterioridad por otros grupos, por ejemplo en neuronas (Höllerhage *et al.* 2009).

La interrupción del normal funcionamiento de la CTE induce una producción elevada de EROs originada por los electrones que se escapan del Complejo I y sus reacciones con el oxígeno molecular presente, afectando al funcionamiento del resto de la cadena respiratoria y al proceso de fosforilación oxidativa. La reducción parcial del oxígeno molecular da lugar al anión radical superóxido. La observación de que la *rotenona*, a dosis en el rango de micromolar, induce la generación de EROs y la consecuente disfunción en el resto de los componentes de la CTE en cultivos, había sido anteriormente descrita (Barrientos *et al.* 1999; Shamoto-Nagai *et al.* 2003), al igual que el aumento de EROs en partículas submitocondriales de ternera tratadas con *rotenona* (Fato *et al.* 2009). Este mismo efecto pudimos también comprobarlo en nuestros estudios al tratar con *rotenona* la línea celular HepG2.

La producción de EROs inducida por *rolliniastatin-1* en partículas submitocondriales de ternera había sido descrita previamente (Fato *et al.* 2008). En el caso de nuestras ACGs, pudimos también observar la producción de EROs en etapas muy tempranas. Así, tras una hora de incubación, tan solo *laherradurin* producía menores niveles de EROs que la *rotenona*. A tiempos más largos, 3-6 horas, la producción EROs era equiparable a la de la *rotenona* para todas las ACGs. Sin embargo, la producción de superóxidos sí fue equiparable para todos los compuestos a tiempos cortos. Esto supuso que aún inhibiendo el

Complejo I con distinta potencia, la producción de EROs a tiempos largos resultó similar. Tanto en estos ensayos como en los realizados con células HepG2 en la presente tesis, se constata que la producción de EROs es uno de los eventos más tempranos asociados a la inhibición del Complejo I.

Otro cambio crucial que tiene lugar en la mitocondria de células sometidas a estrés oxidativo es el descenso del potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi_m$ (Zamzami *et al.* 1996; 2001). La medida del potencial de membrana mitocondrial mediante la sonda *JC1* tras tratamientos a distintas concentraciones y tiempos de incubación con ACGs o con *rotenona*, llevados a cabo por primera vez para las ACGs en el presente estudio, mostró que estos inhibidores del Complejo I producen un descenso efectivo en el $\Delta\Psi_m$. Sin embargo, no todos estos compuestos originaron este cambio con la misma intensidad. *Motrilin* causó un profundo descenso del $\Delta\Psi_m$ a concentraciones bajas y tiempos cortos (1 hora), seguido por *rolliniastatin-1* y *rotenona* que tuvieron un comportamiento similar, mientras que *cherimolin-1* fue la ACG que produjo más lentamente un descenso del $\Delta\Psi_m$. A tiempos más largos (12 horas) todas las ACGs y la *rotenona* produjeron unos altos niveles de despolarización de la membrana mitocondrial. El descenso del $\Delta\Psi_m$ ocasionado por la inhibición del Complejo I ha sido demostrado con anterioridad por otros grupos (Pastorino *et al.* 1993; Zamzami *et al.* 1995; Isenberg *et al.* 2000). Por ejemplo, en hepatocitos de rata se ha descrito que el tratamiento con 5 μM de *rotenona* durante 1 hora disminuía el potencial de membrana mitocondrial en un 20% (Isenberg *et al.* 2000). Nosotros obtuvimos datos muy similares en células HepG2, donde con 6.3 μM de *rotenona* el potencial de membrana disminuyó aproximadamente un 25%. Igualmente, pudimos ver que las ACGs ocasionaban los mismos efectos que la *rotenona* en la mitocondria, con la misma intensidad en el caso de *rolliniastatin-1*, pero con algo menos en el caso de *laherradurin* y *cherimolin-1*, pero, de forma interesante, en *motrilin*, que a concentraciones bajas (6.3 μM) originó un mayor descenso del $\Delta\Psi_m$ que la propia *rotenona*.

Parece ser que cambios importantes en el balance energético (descenso de los niveles de ATP, de NADH y del $\Delta\Psi_m$) o cambios en el equilibrio redox de la célula (oxidación/reducción de los niveles de GSH, aumento de especies reactivas de nitrógeno y de EROs), pueden dar lugar a la permeabilización de la membrana mitocondrial y a la apertura del PPTM (Kroemer *et al.* 1995; Zamzami *et al.* 2001). La apertura del PPTM se puede bloquear por la *ciclosporina A*, la cual se une a la ciclofilina D, localizada en la membrana interna mitocondrial, manteniendo el poro en estado cerrado (Halepstrap *et al.* 1990). La reducción del $\Delta\Psi_m$ y la consecuente inducción de la apertura del PPTM pueden ser eventos críticos en la vía apoptótica originados por tratamientos con inhibidores de CTE (Pastorino *et al.* 1995; Wolventang *et*

al. 1994; Zamzami *et al.* 1996). El tratamiento con 10 μ M de *ciclosporina A* durante una hora disminuyó el grado de muerte celular inducido por las ACGs y por la *rotenona*. En tratamientos a tiempos cortos con *rotenona*, pudimos ver una reducción de niveles de apoptosis, tal y como habían detectado previamente otros grupos (Isenberg *et al.* 2000). Por primera vez este mismo efecto se observó para las ACGs en el tratamiento a tiempos cortos y bajas concentraciones, donde los niveles de apoptosis disminuyeron tras el pre-tratamiento con *ciclosporina A* salvo en el caso de *laherradurin*, donde no pudimos detectar ese retardo. Esto último se debe posiblemente a la cinética de la muerte celular inducida por este compuesto, con un abrupto aumento de apoptosis entre las 12 y las 24 horas. De esta forma, a tiempos cortos, al no haber apoptosis en el tratamiento con *laherradurin*, no pudimos ver ningún efecto, y a tiempos superiores, donde los niveles de apoptosis ya eran muy altos, el tratamiento con *ciclosporina A* ya no era capaz de prevenir la muerte celular. En el resto de inhibidores del Complejo I mitocondrial estudiados sí observamos ese efecto, posiblemente debido a que los niveles de apoptosis aumentaban de manera más lineal.

Ante estos resultados, que demostraban el descenso o colapso del $\Delta\Psi_m$ y la consiguiente apertura del PPTM, necesario para mantener la supervivencia celular (Vayssiere *et al.* 1994; Zamzami *et al.* 1996), decidimos centrar el estudio a continuación en los flujos de calcio de la mitocondria, que actúa como un reservorio de calcio y es capaz de captar calcio del citosol ante un aumento del mismo. Una vez abierto el PPTM, el calcio puede salir al citosol utilizando esta vía, por lo que se debería observar en un aumento en los niveles de calcio citosólico acompañado de un descenso en el calcio mitocondrial (Babcock *et al.* 1997; Tornero *et al.* 2002; Chalmers *et al.* 2007; Szabadkai *et al.* 2008). Por ello decidimos monitorizar el flujo de calcio desde la mitocondria hasta el citosol, mediante dos sondas fluorescentes.

A las tres horas del tratamiento, todas las ACGs a excepción de *laherradurin* mostraron un descenso en los niveles de calcio mitocondrial, pero sólo a la dosis más alta ensayada. A las 12 horas del tratamiento pudimos ver que el calcio estaba ya localizado mayoritariamente en el citosol tras el tratamiento con todos los compuestos y a cualquiera de las dos concentraciones ensayadas, lo que apoyó la hipótesis de que la apertura del poro de transición mitocondrial estaba también implicada en todo el proceso.

Después de estos resultados, que confirmaban la activación de la vía apoptótica mitocondrial tras el tratamiento con ACGs, quisimos determinar si se originaba la activación de la vía de las caspasas, midiendo la actividad de la Caspasa-9 tras su tratamiento. Como control utilizamos *vinblastina*, fármaco antimitótico usado para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (Mukherjee *et al.* 2001).

Todas las ACGs mostraron una menor inducción de la actividad Caspasa-9 que *vinblastina*, salvo *cherimolin-1*, que originó niveles comparables. Ante el tratamiento con el resto de las ACGs (*motrilin*, *laherradurin* y *rolliniastatin-1*) obtuvimos valores de actividad Caspasa-9 similares a los de *rotenona*. A la concentración de 25 μ M en el caso de las ACGs hay un rápido aumento en la actividad Caspasa-9 entre las 12 y 24 horas de tratamiento, que se hace más suave entre las 24 y 48 horas. En contraste, en las células tratadas con *rotenona*, los niveles de Caspasa-9 entre 12 y 24 horas son muy similares, aumentando rápidamente entre las 24 y las 48 horas. A tiempos menores de 12 horas no pudimos detectar actividad Caspasa-9 en cultivos tratados con ACGs y *rotenona* (datos no mostrados). La activación de la cascada de las caspasas por las ACGs ha sido descrita con anterioridad en el tratamiento de células de leucemia (HL60) con *squamocin*, donde se observó activación de Caspasa-3 (Zhu *et al.* 2002). Igualmente se ha descrito que el tratamiento de neuronas con *annonacin* activa la Caspasa-3 (Yuan *et al.* 2003).

La Caspasa-9 activa a las Caspasas -3, -6 y -7, las cuales activan a su vez una serie de endonucleasas nucleares (Viswanath *et al.* 2001), lo cual conduce a las últimas fases de la apoptosis, la condensación de la cromatina, la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y finalmente la muerte celular. Para evaluar el grado de condensación de la cromatina, utilizamos una sonda fluorescente *Hoechst 33342* (Ciancio *et al.* 1988) por su afinidad al ADN.

Tras el tratamiento con las ACGs a la concentración de 6.3 μ M pudimos ver un aumento palpable de la fluorescencia a lo largo del tiempo, indicando una mayor cantidad de cromatina condensada. *Laherradurin* mostró la menor intensidad de señal fluorescente a todos tiempos de incubación, seguida de *cherimolin-1* y *rotenona*. Los tratamientos con *motrilin* y *rolliniastatin-1* mostraron la mayor cantidad de núcleos apoptóticos a tiempos cortos. A la concentración de 25 μ M sólo pudimos ver este efecto a tiempos inferiores a 12 horas, pues a partir de ahí empezamos a detectar una disminución significativa en la cantidad de fluorescencia. Esto podría ser explicado por el propio efecto citotóxico de las ACGs, ya que, como pudimos comprobar por microscopía de fluorescencia, había menor número de células, aunque todas ellas mostraban los núcleos fuertemente teñidos. Este efecto fue más notable para *motrilin* y *rolliniastatin-1*, ya que fueron las ACGs más potentes. Así, para *rolliniastatin-1* detectamos el pico de fluorescencia después de 1 hora de tratamiento, y para *motrilin* a las 6 horas. La condensación de cromatina ocasionada por *rotenona* había sido ya observada previamente en distintas líneas celulares (Li *et al.* 2003; Bi *et al.* 2009). Por otra parte, Zhu *et al.* (2002) describieron la fluorescencia emitida por *Hoechst 33258* tras el tratamiento de células HL60 con *squamocin* durante 24 horas, obteniendo núcleos

altamente fluorescentes que indicaban condensación de cromatina y apoptosis, aunque en dichos trabajos no se realizaron estudios cuantitativos.

Por otro lado, las membranas de las células apoptóticas, a diferencia de las células vivas, son permeables a otra sonda intercalante de ADN, *YO-PRO-1* (Paoluzzi *et al.* 2008). Así, mediante esta sonda pudimos además medir el porcentaje de células apoptóticas tras el tratamiento con las ACGs y la *rotenona*. *Rolliniastatin-1* presentó mayor señal de fluorescencia a todos los tiempos y concentraciones que el resto de las ACGs o que la propia *rotenona*. Al igual que en el ensayo de *Hoechst 33342*, *rolliniastatin-1* a 25 μ M mostró un descenso de fluorescencia a partir de las 3 horas. De forma interesante, *motrilin* también presentó mayor señal de fluorescencia que la *rotenona* a la concentración de 25 μ M, efecto que no fue muy marcado a la concentración de 6.3 μ M. La señal originada por *YO-PRO-1* en células tratadas con *cherimolin-1* y *laherradurin* a tiempos largos (12 horas) resultó equiparable a la señal obtenida con *rotenona*. A tiempos inferiores a 12 horas estas dos ACGs mostraron señales inferiores.

Como último paso utilizamos *PI* para evaluar la muerte celular originada por estos inhibidores del Complejo I mitocondrial. En la última etapa de la apoptosis la célula ha perdido la integridad de la membrana plasmática y esto hace que el *PI* pueda entrar en la célula y se intercale en el ADN, emitiendo fluorescencia roja. En esta fase nos encontramos resultados muy parecidos a los originados con *Hoechst 33342* y *YO-PRO-1*; *rolliniastatin-1* mostró una mayor tasa de muerte celular a tiempos más cortos, presentando un pico de fluorescencia a las 3 horas; *motrilin* también originó mayor muerte celular a tiempos más cortos que las otras dos ACGs o que la *rotenona*. *Laherradurin*, como había ocurrido en todas las etapas anteriores mostró también unos niveles inferiores de muerte celular a tiempos inferiores a 6 horas, alcanzando los mismos niveles que *cherimolin-1* y *rotenona* a las 12 horas de incubación.

En las últimas décadas la *rotenona* ha sido utilizada como modelo de inhibidor del Complejo I mitocondrial y ha sido ampliamente utilizada para el estudio de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. En diversos estudios se ha reportado que la inhibición del Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial juega un papel primordial en la muerte celular inducida por *rotenona* (Jenner *et al.* 2001; Fiskum *et al.* 2003). Radad *et al.* (2006) expusieron los mecanismos moleculares por los cuales la *rotenona* puede originar neurodegeneración. Para ello utilizaron cultivos primarios dopaminérgicos y comprobaron que el tratamiento con *rotenona* a concentraciones muy bajas (20 nM)

durante 48 horas producía una disminución del $\Delta\Psi_m$ así como un aumento de los niveles de EROs y de superóxidos, lo que conducía a la muerte celular.

Nosotros, en la presente tesis doctoral, utilizando una distinta línea celular, HepG2, derivada de hepatocitos, pudimos determinar y confirmar todos estos efectos originados por la *rotenona*, aunque a concentraciones menores. Igualmente pudimos comprobar en todas estas fases que las ACGs tenían el mismo patrón de generación de muerte celular que la *rotenona*, lo que posiblemente explica la muerte celular selectiva que producen estos compuestos sobre líneas celulares tumorales.

Como se ha mencionado anteriormente en referencia a la escasa correlación existente entre la inhibición del Complejo I mitocondrial y la citotoxicidad originada por la ACGs, tampoco pudimos observar una clara correlación entre las potencias inhibitorias del Complejo I y la velocidad de aparición o las potencias sobre las diferentes etapas relacionadas con la apoptosis. Es de resaltar que la ACG más potente frente al Complejo I sea *laherradurin*, que es la que presentó menor citotoxicidad y la más lenta en todas las etapas de la apoptosis. En contraposición, *rolliniastatin-1*, que mostró una potencia intermedia en la inhibición del Complejo I fue, sin embargo, la más rápida y potente en la mayoría de los casos (Figura 17 de Resultados). Se podría especular que ello este hecho este relacionado con su capacidad de unirse a dos sitios del Complejo I simultáneamente (Tormo *et al.* 1999)

No existen muchos trabajos sobre la actividad *in vivo* de las ACGs. En modelos experimentales murinos, los resultados señalaron que su efectividad puede ser comparable o incluso superior a la de algunas drogas antineoplásicas. En ratones atímicos implantados con células de cáncer de ovario humano A2780, *rolliniastatin-2* (*bullatacin*) inhibió el crecimiento de los tumores en un 68%, y *annonacin* redujo el crecimiento del carcinoma murino de pulmón (LLC) en un 58% (Schlie-Guzmán *et al.* 2009). Estudios similares con *rolliniastatin-1*, *cherimolin-2* y *laherradurin* han sido llevados a cabo en ratones con resultados igualmente positivos (McLaughlin *et al.* 2008; Schlie-Guzmán *et al.* 2009). Schlie-Guzmán *et al.* (2009) trataron con *laherradurin* y *cherimolin-1-2* a animales a los que previamente se les había inducido tumores con células HeLa y SW-480. Ambas ACGs redujeron el tamaño de los tumores, *laherradurin* con mayor eficacia que la *rotenona* o la *cherimolin-2*. Un dato relevante, común a todos los estudios *in vivo* hechos por distintos grupos, fue que todos los animales sobrevivieron a los tratamientos, lo que sugiere la posibilidad de que exista una ventana terapéutica efectiva para estos compuestos.

3. ESTUDIO DE CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN SEGURIDAD CARDIACA

Considerando su potencial como posibles agentes de utilidad terapéutica, es importante valorar los posibles efectos adversos que pueden estar asociados a las ACGs. De hecho, se ha descrito ya algunos efectos no deseables producidos por las ACGs. Por ejemplo, se ha documentado que habitantes de la isla de Gualalupe y otras islas tropicales presentan una forma atípica de la enfermedad de Parkinson que podría estar asociada a la ingesta continua de frutos e infusiones de hojas de *Annona muricata* y otras especies de *Annonaceae* ricas en ACGs (McLaughlin, 2008). De hecho, en modelos *in vitro* se ha demostrado que *annonacin* induce, entre otros efectos, una redistribución de la proteína *tau* desde el axón hasta el cuerpo neuronal, reminiscente de procesos neurodegenerativos (Escobar-Khondiker *et al.* 2007). Nosotros decidimos estudiar otro tipo de efectos secundarios que son también clave en la evaluación de posibles candidatos a fármacos, en concreto, quisimos evaluar la posibilidad de que estos compuestos bloqueen determinados canales iónicos involucrados en el potencial de acción cardíaco (Cav1.2, Nav1.5 y hERG).

Los fármacos pueden provocar toxicidad cardíaca generando diversos tipos de efectos adversos sobre el corazón: arritmias y síndrome de QT largo adquirido, insuficiencia cardíaca o hipertensión (Boza *et al.* 2001). Por ello es importante conocer la posible influencia de los candidatos a fármacos en las distintas fases del potencial de acción cardíaco. Para este estudio se seleccionaron tres canales iónicos que son habitualmente estudiados en los procesos de desarrollo de fármacos en la industria farmacéutica; el canal de sodio Nav1.5, responsable de la Fase 0 de despolarización; el canal de calcio Cav1.2 involucrado en la Fase 2 de meseta, y el canal de potasio hERG, involucrado en la Fase 3 de repolarización.

En el caso del canal de sodio cardíaco (Nav1.5), utilizamos un ensayo basado en la técnica de FRET para conocer el comportamiento de este canal ante el tratamiento con ACGs y *rotenona*. Solo tres ACGs de configuración bis-tetrahidrofuránica *treo/trans/treo/trans/eritro* con γ -lactona α,β insaturada, mostraron tener una influencia significativa sobre este canal, en concreto *squamocin*, *guanaconetin-3* y *guanaconetin-4*, que presentaron unas Cl_{50} entre 2-10 μ M. Estas tres ACGs tienen estructuras relativamente semejantes, presentando una distribución de radicales OH parecida. El resto de ACGs de este tipo (*guanaconetin-1*, *motrilin* y *rolliniastatin-1*) que presentan estructuras algo más alejadas mostraron resultados en este ensayo funcional fueron muy distintos. El valor detectado para *squamocin* resultó comparable a los inhibidores clásicos de este canal (*tetrodotoxina* y *tetracaina*). *Iso-rolliniastatin-1*, *rolliniastatin-1* y *laherradurin* mostraron una baja actividad sobre este canal, mientras que el resto de las ACGs no mostraron actividad a ninguna de las concentraciones estudiadas. Con estos datos pudimos

concluir que las ACGs bis-tetrahidrofuránicas resultaron más afines sobre este canal que las mono-tetrahidrofuránicas, las cuales no presentaron actividad, a excepción de una actividad moderada que observamos para *gigantetronenin*.

El hecho de que las ACGs hayan sido descritas como agentes quelantes de Ca^{2+} (Liaw *et al.* 2008) y de que influyan en el flujo intracelular de este ión, nos condujo a estudiar su efecto sobre el canal de calcio de músculo cardíaco (Cav1.2). Inicialmente, nos encontramos con la imposibilidad de determinar el efecto de estos compuestos sobre este canal utilizando un ensayo funcional, pues no conseguimos curvas dosis-respuesta claras y los resultados fueron no concluyentes. Estos resultados podrían explicarse dadas las propiedades ya mencionadas de estos compuestos como quelantes de calcio, así como por su influencia en el flujo dinámico de calcio que se genera durante la cascada de apoptosis entre mitocondria y citosol, dado que interferiría en la medición del flujo de calcio a través del canal Cav1.2. Por ello, decidimos determinar la posible interacción de las ACGs con los canales de calcio de tipo L mediante otros tres ensayos de unión receptor-ligando que permitirían evaluar su afinidad para cada uno de los tres sitios de unión típicos que presenta este canal.

De los resultados pudimos concluir que las ACGs mostraron afinidad por el canal de calcio, aunque no pudimos identificar el sitio específico al que se unen en la mayoría de los casos ya que, en general, fueron capaces de desplazar a los tres ligandos marcados utilizados. Esto se podría explicar por el hecho de que los sitios de unión al canal están muy próximos y la unión a uno de ellos puede originar cambios conformacionales que afectan a los otros dos.

En general, las ACGs bis-tetrahidrofuránicas adyacentes con γ -lactona α,β insaturada presentaron una mayor afinidad por este canal que el resto de familias de ACGs. De entre ellas, *guanaconetin-3* y *guanaconetin-4* resultaron las más activas, con Cl_{50} inferiores a 1 μM en el sitio de unión a benzotiazepinas. *Laherradurin* mostró mucha menor afinidad por el sitio de unión de las benzotiazepinas que por los otros dos. También cabe destacar el comportamiento de *iso-rolliniastatin-1*, que mostró también una menor afinidad por el sitio de unión a benzotiazepinas que por los otros dos (con una diferencia de un orden de magnitud), mientras que *rolliniastatin-1* mostró una afinidad similar frente a los tres sitios de unión. Observamos un efecto similar para *annonacin* y su forma 'iso' frente al sitio de unión a dihidropiridinas, pues *annonacin* mostró una afinidad tres veces superior a *iso-annonacin*.

El conocimiento de los mecanismos del síndrome conocido como QT largo ha experimentado grandes avances en los últimos años y ha permitido conocer mejor el efecto proarrítmico de algunos fármacos.

La importancia de este síndrome radica en que el QT largo se asocia a arritmias ventriculares del tipo *torsades de pointes* que pueden originar síncope y en ocasiones provocar la muerte súbita. El principal canal iónico que ha sido asociado a este tipo de síndrome por su interacción con algunos fármacos es el canal de potasio hERG. Por ello, las autoridades regulatorias han hecho obligatorio el estudio del comportamiento de los posibles futuros fármacos sobre este canal. (*International Conference Harmonization Guideline ICH S7B: The Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation)*).

Cuando realizamos el ensayo de desplazamiento receptor-ligando para comprobar si las ACGs eran capaces de desplazar al inhibidor específico del canal de potasio hERG *MK499*, observamos que, a excepción de *rolliniastatin-1*, que no presentaba afinidad sobre este canal, e *iso-rolliniastatin-1* y *almuñequin* que lo hacían con CI_{50} de aproximadamente 30 μM , el resto de las ACGs desplazaban al *MK499* con CI_{50} inferiores a 14 μM , presentando la mayoría de ellas unas CI_{50} inferiores o muy cercanas al control *astemizol* (1.3 μM). No se pudo determinar la existencia de una relación evidente entre la estructura de las ACGs y su afinidad al sitio de unión del canal de potasio hERG, habida cuenta de que casi todas ellas mostraron una afinidad relativamente similar. Como mucho, se observó que las formas “iso” de las ACGs mono-tetrahidrofuránicas (*iso-annonacin* e *iso-annonacinona*) mostraron mucha menor afinidad que sus correspondientes formas no translactonizadas (*annonacin* y *annonacinona*). La otra ACG “iso” incluida en el estudio, *iso-rolliniastatin-1*, fue igualmente poco potente en este ensayo, pero en este caso su isómero sin translactonizar (*rolliniastatin-1*) fue incluso más débil.

En todo caso, la unión *in vitro* al canal hERG no aseguraba que las ACGs influyeran en la funcionalidad del canal, por lo que decidimos estudiar el comportamiento de las cuatro ACGs seleccionadas (*cherimolin-1*, *motrilin*, *laherradurin* y *rolliniastatin-1*) junto con la *rotenona* ante un ensayo funcional. Los resultados mostraron que ninguna de las ACGs elegidas bloqueaban realmente el canal hERG, aunque tres de ellas habían mostrado alta afinidad en el ensayo de unión receptor-ligando (1-3 μM). La *rotenona* sí presentó una débil influencia en el flujo de iones mediado por el canal, aunque con una CI_{50} muy superior a los controles utilizados en este ensayo (*astemizol*). Estos resultados sugieren una baja probabilidad de que estos compuestos puedan producir efectos secundarios no deseables debidos a su interacción con este canal de potasio hERG.

Considerando en su conjunto los tres canales iónicos estudiados, en general, observamos un comportamiento similar de las ACGs sobre todos ellos. Por ejemplo, *densicomacin* tenía una menor influencia sobre los tres canales en comparación con el otro miembro de la misma familia,

gigantetronenin. De la misma forma, *almuñequin* se comportó como un ligando mucho más débil de los tres canales que los otros miembros de su misma familia, *aromin* y *cherimolin-1*. Pudimos sacar en conclusión que, con pequeñas excepciones, las ACGs bis-tetrahidrofuránicas adyacentes con γ -lactona α,β insaturada presentaban una mayor potencia sobre los tres canales iónicos estudiados, aunque aún teniendo gran afinidad por sus sitios de unión a ligandos, no bloquearon de forma efectiva ninguno de ellos, pues no influían en el flujo de iones a su través, en los casos en los que pudimos evaluar este parámetro. Las únicas ACGs que mostraron una actividad considerable frente a alguno de estos canales fueron *squamocin* y *aromin*, que bloquearon el canal de sodio Nav1.5 con una CI_{50} similar a *tetracaína*.

De los resultados mostrados en la presente tesis pudimos concluir que las ACGs son una familia de compuestos con un perfil aparentemente adecuado para el desarrollo de futuros fármacos antitumorales, no solo por su amplia diversidad química, su potente actividad y su distinto perfil de acción sobre las líneas tumorales, sino porque a las concentraciones a las que causan muerte celular, no se detectaron efectos en los canales de sodio, calcio y potasio cardiacos, por lo que no originarían efectos secundarios adversos sobre el corazón. Por supuesto, cualquier fármaco necesita cumplir muchas otras características farmacocinéticas y farmacodinámicas que en el caso de estos compuestos no se han estudiado, pero los datos existentes hasta la fecha al menos son prometedores.

Por otro lado, los datos obtenidos nos han permitido también determinar que las ACGs tienen afinidad por el sitio de unión a benzotiazepinas del canal de calcio Cav1.2, por lo que podríamos hipotetizar que igualmente podrían tener algún efecto sobre el Receptor Periférico de Benzodiazepinas (PRB) del PPTM y/o sobre el intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la mitocondria, al igual que ha sido descrito para otros inhibidores del canal de calcio de tipo L (Mestre *et al.* 2002; Mohammed *et al.* 2004). Se ha descrito que las benzodiazepinas y algunas fenilalquilaminas son capaces de modular el intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la mitocondria (Ferrari *et al.* 1191; Visch *et al.* 2004). Así, las ACGs podrían estar influyendo en la homeostasis del Ca^{2+} a través de un posible efecto sobre el PRB o sobre el intercambiador Na^+/Ca^{2+} , y podría especularse incluso que esto tuviera relación con las distintas cinéticas de los procesos apoptóticos observada para las diferentes ACGs. Por ejemplo, hemos descrito aquí que *laherradurin* es más lenta en producir efectos apoptóticos sobre la mitocondria, aunque una vez que los causa produce muerte celular a los mismos niveles que, por ejemplo, *rolliniastatin-1*, que produce efectos apoptóticos a tiempos más cortos. Ambas ACGs presentaron un distinto comportamiento frente al canal de calcio, *rolliniastatin-1* mostró más afinidad que *laherradurin*, en particular por el sitio de unión a benzotiazepinas. Por tanto las ACGs, además de inhibir el Complejo I mitocondrial, podrían estar

afectando a otras vías metabólicas relacionadas con la homeostasis del calcio, y esto podría influir en su comportamiento como compuestos citotóxicos.

A pesar de la falta de estudios *in vivo* más rigurosos, las ACGs contenidas en extractos de plantas ricas en estos compuestos, como el *paw paw* (*Asimina triloba*), han sido utilizadas sobre seres humanos en diversas áreas, por ejemplo como champú en tratamientos de pediculosis (McCage *et al.* 2002), o como una combinación de hierbas medicinales para eliminar parásitos intestinales (*Para-Cleanse w/Paw Paw, Nature's Sunshine Products*). El hecho de que los frutos del *paw paw*, que contienen cantidades apreciables de diversas ACGs, hayan sido consumidos de forma tradicional durante siglos sin aparentes efectos nocivos, y que los extractos de esta planta a dosis altas tengan un efecto emético (lo que previene la toxicidad aguda en caso de sobredosis), facilitó que la FDA permitiera su uso experimental en humanos. De esta forma, en Nevada, donde la ley permite el uso de nuevos fármacos que no han pasado ensayos de seguridad en pacientes terminales de cáncer, se utilizaron estos extractos en pacientes con cáncer avanzado de mama, pulmón, próstata, linfático y colorectal. Aparentemente el producto fue efectivo, reduciendo el tamaño de los tumores y los niveles de antígenos tumorales en sangre, además de inhibir metástasis y producir un aumento de la supervivencia, sin observarse anomalías en la función del hígado, riñón o médula ósea (McLaughlin *et al.* 2008). En 2003 el producto fue introducido en el mercado en EEUU como suplemento dietético (*Paw Paw Cell Reg, Nature's Sunshine Products*), aunque estas propiedades terapéuticas no se señalan de forma explícita por el fabricante, por razones legales.

En general, como hemos descrito, en base a los resultados obtenidos en la presente tesis y a los estudios realizados por otros grupos, las ACGs presentan un claro potencial como posibles fármacos antitumorales. Debido a la gran cantidad de ACGs existentes y a su diversidad estructural, es necesario un estudio exhaustivo de esta familia con el fin de seleccionar más potentes, con mejor farmacocinética y que causen los menores daños adversos a las concentraciones terapéuticas, que podrían ser optimizadas mediante modificaciones químicas. Hasta el momento los estudios realizados por los diversos grupos de investigación hacen difícil extraer unas conclusiones generales al haber utilizado distintas líneas tumorales y distintas ACGs. En cualquier caso, para poder hacer efectivo este potencial es indispensable realizar además un buen número de estudios con modelos *in vivo* que respondan no sólo a preguntas relacionadas con su seguridad y farmacocinética, sino también que ayuden a discernir los tipos de tumores contra los que podrían ser más eficaces.

1. Las ACGs de Annonaceas estudiadas mostraron actividad citotóxica frente a todas las líneas tumorales ensayadas, con potencias del mismo orden o superiores a las de fármacos utilizados en quimioterapia como la *doxorubicina* o la *actinomicina* D. En general, la línea celular más sensible a las ACGs de Annonaceas fue la derivada de carcinoma hepatocelular (HepG2), seguida de la línea de adenocarcinoma de mama (MCF-7). Por el contrario, la línea celular de carcinoma de pulmón (A549) fue en general la más resistente a estos compuestos.
2. Las ACGs presentaron en general una potente actividad citotóxica sobre la línea tumoral de útero con multiresistencia a fármacos (MES-SA/Dx5). En el caso de *rolliniastatin-1*, esta actividad fue significativamente más potente que frente a la misma línea celular sensible a fármacos (MES-SA).
3. Algunas de las ACGs ensayadas mostraron cierta selectividad en líneas tumorales con respecto a las no tumorales. La selectividad fue especialmente significativa frente a la línea tumoral de pulmón (A549) y en menor medida frente a la línea de glándula mamaria tumoral (MCF-7).
4. No se observó para las ACGs ensayadas una correlación clara entre estructura química y actividad biológica en el ensayo de citotoxicidad, aunque se observaron algunos patrones comunes para algunas de ellas de estructura química afín. Por ejemplo, las formas “iso” (*iso-rolliniastatin-1*, *iso-annonacin* e *iso-annonacinona*) mostraron una potencia similar sobre las líneas tumorales con respecto a sus correspondientes ACGs sin translactonizar, y una citotoxicidad significativamente menor sobre la línea celular sana de pulmón (CCD 16Lu).
5. No se observó correlación entre la potencia de las ACGs en la inhibición del Complejo I mitocondrial en partículas sub-mitocondriales de corazón de ternera y los resultados de citotoxicidad en líneas tumorales humanas. Por ejemplo, *cherimolin-1*, que es mucho menos potente que *laherraudirin* como inhibidor del Complejo I, presentó en general una mayor actividad citotóxica, de manera particularmente notable sobre la línea HepG2.
6. Las cuatro ACGs seleccionadas para los estudios detallados (*laherradurin*, *motrilin*, *rolliniastatin-1* y *cherimolin-1*) indujeron muerte celular activando la vía apoptótica mitocondrial de forma semejante a como había sido descrita previamente para la *rotenona*. Todos los eventos monitorizados en el presente estudio que han sido caracterizados como parte de la cascada apoptótica mitocondrial fueron inducidos por las ACGs con intensidades y tiempos de respuesta diferentes.

7. No hubo correlación entre la potencia en la inhibición del Complejo I y la velocidad de aparición de los eventos de la cascada apoptótica o la intensidad de los mismos. En general, *rolliniastatin-1* (sitio A/B) fue más rápida en la inducción de la mayoría de estos fenómenos y/o produjo los efectos más intensos, seguida por *motrilin* (sitio B), mientras que *laherradurin* (sitio B) fue más lenta en todos los casos. La excepción más notable a esta tendencia general fue la activación de la actividad Caspasa-9, que en el caso de *cherimolin-1* (sitio A) fue mucho más intensa que para el resto de ACGs ensayadas.
8. Sí se observó correlación entre la velocidad de aparición de los eventos de la cascada apoptótica y la velocidad a la que se desencadenaba citotoxicidad o muerte celular. Así, *laherradurin*, resultó ser la ACG más lenta en ocasionar muerte celular, que sólo pudo observarse tras 24 horas de incubación. Sin embargo *rolliniastatin-1*, produjo muerte celular ya claramente observable tras 1 hora de tratamiento a las mismas dosis.
9. Las ACGs estudiadas mostraron cierta afinidad *in vitro* por el canal de potasio hERG, pero no bloquearon el flujo de iones en ensayo funcional. También mostraron afinidad por los canales de calcio Cav1.2, pero su actividad en ensayo funcional no pudo ser caracterizada. En el ensayo funcional de sodio Nav1.5, pese a que algunas de las ACGs ensayadas presentaron actividad a concentraciones comparables a los controles (particularmente *squamocin* y *aromin*), la mayoría de ellas no mostraron actividad significativa. Por ello podemos indicar que las ACGs presentarían un perfil de seguridad cardiovascular aparentemente adecuado para su posible desarrollo como futuros fármacos antitumorales.
10. En general, las ACGs presentaron un claro potencial como posibles fármacos antitumorales, resultando justificado el estudio exhaustivo de cada miembro de esta familia de compuestos, así como de los mecanismos de acción de sus actividades biológicas con el fin de determinar aquellas más potentes, con mejor farmacocinética y que causen los menores daños adversos, pudiendo considerarse claramente posibles candidatos a procesos de optimización en el desarrollo de futuros fármacos.

1. Abraham, V. C., Towne, D. L., Waring, J. F., Warrior, U., and Burns, D. J. (2008) Application of a high-content multiparameter cytotoxicity assay to prioritize compounds based on toxicity potential in humans, *J Biomol Screen* 13, 527-537.
2. Alali, F. Q., Liu, X. X., and McLaughlin, J. L. (1999) Annonaceous acetogenins: recent progress, *J Nat Prod* 62, 504-540.
3. Babcock, D. F., Herrington, J., Goodwin, P. C., Park, Y. B., and Hille, B. (1997) Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network, *J Cell Biol* 136, 833-844.
4. Balser, J. R. (1999) Structure and function of the cardiac sodium channels, *Cardiovasc Res* 42, 327-338.
5. Barrachina, I., Royo, I., Baldoni, H. A., Chahboune, N., Suvire, F., DePedro, N., Zafra-Polo, M. C., Bermejo, A., El Aouad, N., Cabedo, N., Saez, J., Tormo, J. R., Enriz, R. D., and Cortes, D. (2007) New antitumoral acetogenin 'Guanacone type' derivatives: isolation and bioactivity. Molecular dynamics simulation of diacetyl-guanacone, *Bioorg Med Chem* 15, 4369-4381.
6. Barrientos, A., and Moraes, C. T. (1999) Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology, *J Biol Chem* 274, 16188-16197.
7. Batandier, C., Leverve, X., and Fontaine, E. (2004) Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I, *J Biol Chem* 279, 17197-17204.
8. Beacham, D. W., Blackmer, T., M, O. G., and Hanson, G. T. (2010) Cell-based potassium ion channel screening using the FluxOR assay, *J Biomol Screen* 15, 441-446.
9. Bean, B. P. (1984) Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6388-6392.
10. Bean, B. P. (1989) Multiple types of calcium channels in heart muscle and neurons. Modulation by drugs and neurotransmitters, *Ann N Y Acad Sci* 560, 334-345.
11. Bean, B. P. (1989) Classes of calcium channels in vertebrate cells, *Annu Rev Physiol* 51, 367-384.

12. Bermejo, A., Figadere, B., Zafra-Polo, M. C., Barrachina, I., Estornell, E., and Cortes, D. (2005) Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action, *Nat Prod Rep* 22, 269-303.
13. Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blachly-Dyson, E., Di Lisa, F., and Forte, M. A. (2006) The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target, *FEBS J* 273, 2077-2099.
14. Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., and Greenamyre, J. T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease, *Nat Neurosci* 3, 1301-1306.
15. Bi, J., Jiang, B., Hao, S., Zhang, A., Dong, Y., Jiang, T., and An, L. (2009) Catalpol attenuates nitric oxide increase via ERK signaling pathways induced by rotenone in mesencephalic neurons, *Neurochem Int* 54, 264-270.
16. Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A. L., Sadoul, R., and Verna, J. M. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease, *Prog Neurobiol* 65, 135-172.
17. Buckman, J. F., and Reynolds, I. J. (2001) Spontaneous changes in mitochondrial membrane potential in cultured neurons, *J Neurosci* 21, 5054-5065.
18. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis, *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 269-290.
19. Cecconi, F. (1999) Apaf1 and the apoptotic machinery, *Cell Death Differ* 6, 1087-1098.
20. Chahboune, N., Barrachina, I., Royo, I., Romero, V., Saez, J., Tormo, J. R., De Pedro, N., Estornell, E., Zafra-Polo, M. C., Pelaez, F., and Cortes, D. (2006) Guanaconetins, new antitumoral acetogenins, mitochondrial complex I and tumor cell growth inhibitors, *Bioorg Med Chem* 14, 1089-1094.
21. Chalmers, S., and McCarron, J. G. (2008) The mitochondrial membrane potential and Ca²⁺ oscillations in smooth muscle, *J Cell Sci* 121, 75-85.

22. Chen, M. J., Yap, Y. W., Choy, M. S., Koh, C. H., Seet, S. J., Duan, W., Whiteman, M., and Cheung, N. S. (2006) Early induction of calpains in rotenone-mediated neuronal apoptosis, *Neurosci Lett* 397, 69-73.
23. Ciancio, G., Pollack, A., Taupier, M. A., Block, N. L., and Irvin, G. L., 3rd. (1988) Measurement of cell-cycle phase-specific cell death using Hoechst 33342 and propidium iodide: preservation by ethanol fixation, *J Histochem Cytochem* 36, 1147-1152.
24. Corine, V.; Coiffard, C.; Coifard, L.J.M.; Rivalland, P.; De Roeck-Holtzhauer, Y. (1998) In vitro correlation between two colorimetric assays and the pyruvic acid consumption by fibroblasts cultured to determine the sodium laurylsulfate cytotoxicity. *J. Pharmacol. Toxicol.* 39:143-146.
25. Cragg, G. M. (2002) Natural product drug discovery and development: the United States National Cancer Institute role, *P R Health Sci J* 21, 97-111.
26. Cragg, G. M., and Newman, D. J. (2005) Plants as a source of anti-cancer agents, *J Ethnopharmacol* 100, 72-79.
27. Cragg, G. M., Grothaus, P. G., and Newman, D. J. (2009) Impact of natural products on developing new anti-cancer agents, *Chem Rev* 109, 3012-3043.
28. Crompton, M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death, *Biochem J* 341 (Pt 2), 233-249.
29. Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2000) Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis, *FEBS Lett* 476, 118-123.
30. Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M. C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., and Kroemer, G. (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis, *FASEB J* 14, 729-739.
31. Degli Esposti, M., and Ghelli, A. (1994) The mechanism of proton and electron transport in mitochondrial complex I, *Biochim Biophys Acta* 1187, 116-120.

32. Degli Esposti, M., Ghelli, A., Ratta, M., Cortes, D., and Estornell, E. (1994) Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I), *Biochem J* 301 (Pt 1), 161-167.
33. Desagher, S., and Martinou, J. C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trends Cell Biol* 10, 369-377.
34. Dubin, M., and Stoppani, A. O. (2000) Programmed cell death and apoptosis. The role of mitochondria, *Medicina (B Aires)* 60, 375-386.
35. Dykens, J. A. (1994) Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^+ : implications for neurodegeneration, *J Neurochem* 63, 584-591.
36. Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
37. Eparvier, V., Nguyen, V. H., Thoison, O., Martin, M. T., Sevenet, T., and Gueritte, F. (2006) Cytotoxic monotetrahydrofuran acetogenins from *Disepalum plagioneurum*, *J Nat Prod* 69, 1289-1294.
38. Escobar-Khondiker, M., Hollerhage, M., Muriel, M. P., Champy, P., Bach, A., Depienne, C., Respondek, G., Yamada, E. S., Lannuzel, A., Yagi, T., Hirsch, E. C., Oertel, W. H., Jacob, R., Michel, P. P., Ruberg, M., and Hoglinger, G. U. (2007) Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons, *J Neurosci* 27, 7827-7837.
39. Estornell, E., Fato, R., Castelluccio, C., Cavazzoni, M., Parenti Castelli, G., and Lenaz, G. (1992) Saturation kinetics of coenzyme Q in NADH and succinate oxidation in beef heart mitochondria, *FEBS Lett* 311, 107-109.
40. Estornell, E., Fato, R., Pallotti, F., and Lenaz, G. (1993) Assay conditions for the mitochondrial NADH:coenzyme Q oxidoreductase, *FEBS Lett* 332, 127-131.
41. Evan, G. I., and Vousden, K. H. (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer, *Nature* 411, 342-348.

42. Fato, R., Estornell, E., Di Bernardo, S., Pallotti, F., Parenti Castelli, G., and Lenaz, G. (1996) Steady-state kinetics of the reduction of coenzyme Q analogs by complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in bovine heart mitochondria and submitochondrial particles, *Biochemistry* 35, 2705-2716.
43. Fato, R., Bergamini, C., Bortolus, M., Maniero, A. L., Leoni, S., Ohnishi, T., and Lenaz, G. (2009) Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species, *Biochim Biophys Acta* 1787, 384-392.
44. Felix, J. P., Williams, B. S., Priest, B. T., Brochu, R. M., Dick, I. E., Warren, V. A., Yan, L., Slaughter, R. S., Kaczorowski, G. J., Smith, M. M., and Garcia, M. L. (2004) Functional assay of voltage-gated sodium channels using membrane potential-sensitive dyes, *Assay Drug Dev Technol* 2, 260-268.
45. Fennell, D. A., Corbo, M., Pallaska, A., and Cotter, F. E. (2001) Bcl-2 resistant mitochondrial toxicity mediated by the isoquinoline carboxamide PK11195 involves de novo generation of reactive oxygen species, *Br J Cancer* 84, 1397-1404.
46. Fernandez, D., Ghanta, A., Kauffman, G. W., and Sanguinetti, M. C. (2004) Physicochemical features of the HERG channel drug binding site, *J Biol Chem* 279, 10120-10127.
47. Ferrari, R., and Visioli, O. (1991) Calcium channel blockers and ischaemic heart disease: theoretical expectations and clinical experience, *Eur Heart J* 12 Suppl F, 18-24.
48. Finlayson, K., Witchel, H. J., McCulloch, J., and Sharkey, J. (2004) Acquired QT interval prolongation and HERG: implications for drug discovery and development, *Eur J Pharmacol* 500, 129-142.
49. Fiskum, G., Starkov, A., Polster, B. M., and Chinopoulos, C. (2003) Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease, *Ann N Y Acad Sci* 991, 111-119.
50. Fulda, S., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2010) Targeting mitochondria for cancer therapy, *Nat Rev Drug Discov* 9, 447-464.
51. Garcia, M. L., Trumble, M. J., Reuben, J. P., and Kaczorowski, G. J. (1984) Characterization of verapamil binding sites in cardiac membrane vesicles, *J Biol Chem* 259, 15013-15016.

52. George, A. L., Jr., Varkony, T. A., Drabkin, H. A., Han, J., Knops, J. F., Finley, W. H., Brown, G. B., Ward, D. C., and Haas, M. (1995) Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na⁺ channel alpha-subunit gene (SCN5A) to band 3p21, *Cytogenet Cell Genet* 68, 67-70.
53. Giacomello, M., Drago, I., Pizzo, P., and Pozzan, T. (2007) Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death, *Cell Death Differ* 14, 1267-1274.
54. Giuliani, A., Lorenzini, L., Gallamini, M., Massella, A., Giardino, L., and Calza, L. (2009) Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress, *BMC Complement Altern Med* 9, 8.
55. Glossmann, H., Linn, T., Rombusch, M., and Ferry, D. R. (1983) Temperature-dependent regulation of d-cis-[³H]diltiazem binding to Ca²⁺ channels by 1,4-dihydropyridine channel agonists and antagonists, *FEBS Lett* 160, 226-232.
56. Green, D., and Kroemer, G. (1998) The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?, *Trends Cell Biol* 8, 267-271.
57. Greenamyre, J. T., Sherer, T. B., Betarbet, R., and Panov, A. V. (2001) Complex I and Parkinson's disease, *IUBMB Life* 52, 135-141.
58. Greenamyre, J. T., Betarbet, R., and Sherer, T. B. (2003) The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria, *Parkinsonism Relat Disord* 9 Suppl 2, S59-64.
59. Halestrap, A. P., and Davidson, A. M. (1990) Inhibition of Ca²⁺-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase, *Biochem J* 268, 153-160.
60. Hensley, K., Pye, Q. N., Maidt, M. L., Stewart, C. A., Robinson, K. A., Jaffrey, F., and Floyd, R. A. (1998) Interaction of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrone and alternative electron acceptors with complex I indicates a substrate reduction site upstream from the rotenone binding site, *J Neurochem* 71, 2549-2557.
61. Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J Physiol* 117, 500-544.

62. Hoffman, B. F. (1962) Electrophysiology of the conducting system of the heart, *Trans N Y Acad Sci* 24, 886-890.
63. Hollerhage, M., Matusch, A., Champy, P., Lombes, A., Ruberg, M., Oertel, W. H., and Hoglinger, G. U. (2009) Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies, *Exp Neurol* 220, 133-142.
64. Huang, C. J., Harootunian, A., Maher, M. P., Quan, C., Raj, C. D., McCormack, K., Numann, R., Negulescu, P. A., and Gonzalez, J. E. (2006) Characterization of voltage-gated sodium-channel blockers by electrical stimulation and fluorescence detection of membrane potential, *Nat Biotechnol* 24, 439-446.
65. Idziorek, T., Estaquier, J., De Bels, F., and Ameisen, J. C. (1995) YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability, *J Immunol Methods* 185, 249-258.
66. Isenberg, J. S., and Klaunig, J. E. (2000) Role of the mitochondrial membrane permeability transition (MPT) in rotenone-induced apoptosis in liver cells, *Toxicol Sci* 53, 340-351.
67. Jenner, P. (2001) Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction, *Trends Neurosci* 24, 245-247.
68. Jeong, S. Y., and Seol, D. W. (2008) The role of mitochondria in apoptosis, *BMB Rep* 41, 11-22.
69. Jolad, S. D., Hoffmann, J. J., Cole, J. R., Barry, C. E., 3rd, Bates, R. B., Linz, G. S., and Konig, W. A. (1985) Desacetyluvaricin from *Uvaria accuminata*, configuration of uvaricin at C-36, *J Nat Prod* 48, 644-645.
70. Katori, H., Nozawa, A., and Tsukuda, M. (2007) Cell proliferation, apoptosis, and apoptosis inhibition in malignant transformation of sinonasal inverted papilloma, *Acta Otolaryngol* 127, 540-546.
71. Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J. L., and Mignotte, B. (1995) The biochemistry of programmed cell death, *FASEB J* 9, 1277-1287.

72. Kushnareva, Y., Murphy, A. N., and Andreyev, A. (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state, *Biochem J* 368, 545-553.
73. Lanza, I. R., and Nair, K. S. (2009) Functional assessment of isolated mitochondria in vitro, *Methods Enzymol* 457, 349-372.
74. Lecoecur, H. (2002) Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases, *Exp Cell Res* 277, 1-14.
75. Leyssens, A., Nowicky, A. V., Patterson, L., Crompton, M., and Duchen, M. R. (1996) The relationship between mitochondrial state, ATP hydrolysis, [Mg²⁺]_i and [Ca²⁺]_i studied in isolated rat cardiomyocytes, *J Physiol* 496 (Pt 1), 111-128.
76. Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A., and Robinson, J. P. (2003) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production, *J Biol Chem* 278, 8516-8525.
77. Li, Z., and Xing, D. (2010) Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity using fluorescence techniques, *J Exp Bot*.
78. Liaw, C. C., Yang, Y. L., Chen, M., Chang, F. R., Chen, S. L., Wu, S. H., and Wu, Y. C. (2008) Monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* as cytotoxic agents and calcium ion chelators, *J Nat Prod* 71, 764-771.
79. Lindahl, P. E., and Oberg, K. E. (1961) The effect of rotenone on respiration and its point of attack, *Exp Cell Res* 23, 228-237.
80. Liu, H. X., Huang, G. R., Zhang, H. M., Wu, J. R., and Yao, Z. J. (2007) Annonaceous acetogenin mimics bearing a terminal lactam and their cytotoxicity against cancer cells, *Bioorg Med Chem Lett* 17, 3426-3430.
81. Liu, K., Yang, T., Viswanathan, P. C., and Roden, D. M. (2005) New mechanism contributing to drug-induced arrhythmia: rescue of a misprocessed LQT3 mutant, *Circulation* 112, 3239-3246.

-
82. Liu, Y., and Nair, M. G. (2010) An efficient and economical MTT assay for determining the antioxidant activity of plant natural product extracts and pure compounds, *J Nat Prod* 73, 1193-1195.
 83. Loeffler, M., and Kroemer, G. (2000) The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita, *Exp Cell Res* 256, 19-26.
 84. Lopez-Lazaro, M., Martin-Cordero, C., Bermejo, A., Cortes, D., and Ayuso, M. J. (2001) Cytotoxic compounds from *Annonaceus* species as DNA topoisomerase I poisons, *Anticancer Res* 21, 3493-3497.
 85. Malorni, W., Giammarioli, A. M., Matarrese, P., Pietrangeli, P., Agostinelli, E., Ciaccio, A., Grassilli, E., and Mondovi, B. (1998) Protection against apoptosis by monoamine oxidase A inhibitors, *FEBS Lett* 426, 155-159.
 86. Marshall, J. A., Sabatini, J. J., and Valeriote, F. (2007) ABC synthesis and antitumor activity of a series of *Annonaceous* acetogenin analogs with a threo, trans, threo, trans, threo-bis-tetrahydrofuran core unit, *Bioorg Med Chem Lett* 17, 2434-2437.
 87. Martin, V. V., Beierlein, M., Morgan, J. L., Rothe, A., and Gee, K. R. (2004) Novel fluo-4 analogs for fluorescent calcium measurements, *Cell Calcium* 36, 509-514.
 88. McLaughlin, J. L. (2008) Paw paw and cancer: *annonaceous* acetogenins from discovery to commercial products, *J Nat Prod* 71, 1311-1321.
 89. Mestre, M., Carriot, T., Belin, C., Uzan, A., Renault, C., Dubroeuq, M. C., Gueremy, C., and Le Fur, G. (1984) Electrophysiological and pharmacological characterization of peripheral benzodiazepine receptors in a guinea pig heart preparation, *Life Sci* 35, 953-962.
 90. Miyoshi, H., Ohshima, M., Shimada, H., Akagi, T., Iwamura, H., and McLaughlin, J. L. (1998) Essential structural factors of *annonaceous* acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I, *Biochim Biophys Acta* 1365, 443-452.
 91. Montero, M., Alonso, M. T., Albillos, A., Garcia-Sancho, J., and Alvarez, J. (2001) Mitochondrial Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release mediated by the Ca^{2+} uniporter, *Mol Biol Cell* 12, 63-71.

92. Moore, A., Donahue, C. J., Bauer, K. D., and Mather, J. P. (1998) Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death, *Methods Cell Biol* 57, 265-278.
93. Moreno-Sanchez, R., Hogue, B. A., Bravo, C., Newman, A. H., Basile, A. S., and Chiang, P. K. (1991) Inhibition of substrate oxidation in mitochondria by the peripheral-type benzodiazepine receptor ligand AHN 086, *Biochem Pharmacol* 41, 1479-1484.
94. Morre, D. J., de Cabo, R., Farley, C., Oberlies, N. H., and McLaughlin, J. L. (1995) Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HeLa and HL-60, but not liver, plasma membranes, *Life Sci* 56, 343-348.
95. Motoyama, T., Yabunaka, H., and Miyoshi, H. (2002) Essential structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I, *Bioorg Med Chem Lett* 12, 2089-2092.
96. Mukherjee, A. K., Basu, S., Sarkar, N., and Ghosh, A. C. (2001) Advances in cancer therapy with plant based natural products, *Curr Med Chem* 8, 1467-1486.
97. Nicholls, D. G., and Budd, S. L. (2000) Mitochondria and neuronal survival, *Physiol Rev* 80, 315-360.
98. Niles, A. L., Moravec, R. A., Eric Hesselberth, P., Scurria, M. A., Daily, W. J., and Riss, T. L. (2007) A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers, *Anal Biochem* 366, 197-206.
99. Panaretakis, T., Shabalina, I. G., Grander, D., Shoshan, M. C., and DePierre, J. W. (2001) Reactive oxygen species and mitochondria mediate the induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells by the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid, *Toxicol Appl Pharmacol* 173, 56-64.
100. Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Taylor, G., Sherer, T., and Greenamyre, J. T. (2005) Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication, *J Biol Chem* 280, 42026-42035.
101. Paoluzzi, L., Gonen, M., Gardner, J. R., Mastrella, J., Yang, D., Holmlund, J., Sorensen, M., Leopold, L., Manova, K., Marcucci, G., Heaney, M. L., and O'Connor, O. A. (2008) Targeting Bcl-2 family members with the BH3 mimetic AT-101 markedly enhances the therapeutic effects of

chemotherapeutic agents in in vitro and in vivo models of B-cell lymphoma, *Blood* 111, 5350-5358.

102. Pastorino, J. G., Snyder, J. W., Serroni, A., Hoek, J. B., and Farber, J. L. (1993) Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition, *J Biol Chem* 268, 13791-13798.
103. Pastorino, J. G., Wilhelm, T. J., Glascott, P. A., Jr., Kocsis, J. J., and Farber, J. L. (1995) Dexamethasone induces resistance to the lethal consequences of electron transport inhibition in cultured hepatocytes, *Arch Biochem Biophys* 318, 175-181.
104. Plantin-Carrenard, E., Bringuier, A., Derappe, C., Pichon, J., Guillot, R., Bernard, M., Foglietti, M. J., Feldmann, G., Aubery, M., and Braut-Boucher, F. (2003) A fluorescence microplate assay using yopro-1 to measure apoptosis: application to HL60 cells subjected to oxidative stress, *Cell Biol Toxicol* 19, 121-133.
105. Raab, C. E., Butcher, J. W., Connolly, T. M., Karczewski, J., Yu, N. X., Staskiewicz, S. J., Liverton, N., Dean, D. C., and Melillo, D. G. (2006) Synthesis of the first sulfur-35-labeled hERG radioligand, *Bioorg Med Chem Lett* 16, 1692-1695.
106. Radad, K., Rausch, W. D., and Gille, G. (2006) Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration, *Neurochem Int* 49, 379-386.
107. Ramsay, R. R., Krueger, M. J., Youngster, S. K., Gluck, M. R., Casida, J. E., and Singer, T. P. (1991) Interaction of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) and its analogs with the rotenone/piericidin binding site of NADH dehydrogenase, *J Neurochem* 56, 1184-1190.
108. Rogart, R. B., deBruyn Kops, A., and Dzau, V. J. (1986) Identification of two calcium channel receptor sites for [³H]nitrendipine in mammalian cardiac and smooth muscle membrane, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 7452-7456.
109. Royo, I., DePedro, N., Estornell, E., Cortes, D., Pelaez, F., and Tormo, J. R. (2003) In vitro antitumor SAR of threo/cis/threo/cis/erythro bis-THF acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial Complex I, *Oncol Res* 13, 521-528.

110. Ruch, R. J., Crist, K. A., and Klaunig, J. E. (1989) Effects of culture duration on hydrogen peroxide-induced hepatocyte toxicity, *Toxicol Appl Pharmacol* 100, 451-464.
111. Ruiz, F., Alvarez, G., Ramos, M., Hernandez, M., Bogonez, E., and Satrustegui, J. (2000) Cyclosporin A targets involved in protection against glutamate excitotoxicity, *Eur J Pharmacol* 404, 29-39.
112. Sanguinetti, M. C., and Mitcheson, J. S. (2005) Predicting drug-hERG channel interactions that cause acquired long QT syndrome, *Trends Pharmacol Sci* 26, 119-124.
113. Satoh, T., Sakai, N., Enokido, Y., Uchiyama, Y., and Hatanaka, H. (1996) Survival factor-insensitive generation of reactive oxygen species induced by serum deprivation in neuronal cells, *Brain Res* 733, 9-14.
114. Schlie-Guzman, M. A., Garcia-Carranca, A., and Gonzalez-Esquinca, A. R. (2009) In vitro and in vivo antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff, *Phytother Res* 23, 1128-1133.
115. Seaton, T. A., Cooper, J. M., and Schapira, A. H. (1997) Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors, *Brain Res* 777, 110-118.
116. Shah, R. R. (2002) The significance of QT interval in drug development, *Br J Clin Pharmacol* 54, 188-202.
117. Shamoto-Nagai, M., Maruyama, W., Kato, Y., Isobe, K., Tanaka, M., Naoi, M., and Osawa, T. (2003) An inhibitor of mitochondrial complex I, rotenone, inactivates proteasome by oxidative modification and induces aggregation of oxidized proteins in SH-SY5Y cells, *J Neurosci Res* 74, 589-597.
118. Sherer, T. B., Betarbet, R., and Greenamyre, J. T. (2002) Environment, mitochondria, and Parkinson's disease, *Neuroscientist* 8, 192-197.
119. Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T., and Tsujimoto, Y. (2000) BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3100-3105.

120. Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., and Salvesen, G. S. (1999) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing, *J Biol Chem* 274, 8359-8362.
121. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature* 397, 441-446.
122. Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T., and Takata, K. (1997) DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy, *J Histochem Cytochem* 45, 49-53.
123. Szabadkai, G., and Duchen, M. R. (2008) Mitochondria: the hub of cellular Ca^{2+} signaling, *Physiology (Bethesda)* 23, 84-94.
124. Tamargo, J., Valenzuela, C., and Delpon, E. (1992) New insights into the pharmacology of sodium channel blockers, *Eur Heart J* 13 Suppl F, 2-13.
125. Tormo, J. R., DePedro, N., Royo, I., Barrachina, I., Zafra-Polo, M. C., Cuadrillero, C., Hernandez, P., Cortes, D., and Pelaez, F. (2005) In vitro antitumor structure-activity relationships of threo/trans/threo/trans/erythro bis-tetrahydrofuranic acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I, *Oncol Res* 15, 129-138.
126. Tormo, J. R., and Estornell, E. (2000) New evidence for the multiplicity of ubiquinone- and inhibitor-binding sites in the mitochondrial complex I, *Arch Biochem Biophys* 381, 241-246.
127. Tormo, J. R., Estornell, E., Gallardo, T., Gonzalez, M. C., Cave, A., Granell, S., Cortes, D., and Zafra-Polo, M. C. (2001) Gamma-lactone-Functionalized antitumoral acetogenins are the most potent inhibitors of mitochondrial complex I, *Bioorg Med Chem Lett* 11, 681-684.
128. Tormo, J. R., Gonzalez, M. C., Cortes, D., and Estornell, E. (1999) Kinetic characterization of mitochondrial complex I inhibitors using annonaceous acetogenins, *Arch Biochem Biophys* 369, 119-126.
129. Tormo, J. R., Royo, I., Gallardo, T., Zafra-Polo, M. C., Hernandez, P., Cortes, D., and Pelaez, F. (2003) In vitro antitumor structure-activity relationships of threo/trans/threo mono-tetrahydrofuranic acetogenins: correlations with their inhibition of mitochondrial complex I, *Oncol Res* 14, 147-154.

-
130. Tornero, D., Cena, V., Gonzalez- Garcia, C., and Jordan, J. (2002) [The role of the mitochondrial permeability transition pore in neurodegenerative processes], *Rev Neurol* 35, 354-361.
131. Vayssiere, J. L., Petit, P. X., Risler, Y., and Mignotte, B. (1994) Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11752-11756.
132. Vickers, S., Duncan, C. A., Slaughter, D. E., Arison, B. H., Greber, T., Olah, T. V., and Vyas, K. P. (1998) Metabolism of MK-499, a class III antiarrhythmic agent, in rats and dogs, *Drug Metab Dispos* 26, 388-395.
133. Visch, H. J., Rutter, G. A., Koopman, W. J., Koenderink, J. B., Verkaart, S., de Groot, T., Varadi, A., Mitchell, K. J., van den Heuvel, L. P., Smeitink, J. A., and Willems, P. H. (2004) Inhibition of mitochondrial Na^+ - Ca^{2+} exchange restores agonist-induced ATP production and Ca^{2+} handling in human complex I deficiency, *J Biol Chem* 279, 40328-40336.
134. Viswanath, V., Wu, Y., Boonplueang, R., Chen, S., Stevenson, F. F., Yantiri, F., Yang, L., Beal, M. F., and Andersen, J. K. (2001) Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease, *J Neurosci* 21, 9519-9528.
135. Wang, Q., Shen, J., Li, Z., Timothy, K., Vincent, G. M., Priori, S. G., Schwartz, P. J., and Keating, M. T. (1995) Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia, *Hum Mol Genet* 4, 1603-1607.
136. Wang, X. J., and Xu, J. X. (2005) Possible involvement of Ca^{2+} signaling in rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Neurosci Lett* 376, 127-132.
137. Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G., and Preis, D. (1991) The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria, *Eur J Biochem* 197, 563-576.
138. West, J. W., Patton, D. E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A. L., and Catterall, W. A. (1992) A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na^+ -channel inactivation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10910-10914.
139. White, R. J., and Reynolds, I. J. (1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure, *J Neurosci* 16, 5688-5697.

140. Wolvetang, E. J., Johnson, K. L., Krauer, K., Ralph, S. J., and Linnane, A. W. (1994) Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis, *FEBS Lett* 339, 40-44.
141. Wunberg, T., Hendrix, M., Hillisch, A., Lobell, M., Meier, H., Schmeck, C., Wild, H., and Hinzen, B. (2006) Improving the hit-to-lead process: data-driven assessment of drug-like and lead-like screening hits, *Drug Discov Today* 11, 175-180.
142. Xia, M., Imredy, J. P., Koblan, K. S., Bennett, P., and Connolly, T. M. (2004) State-dependent inhibition of L-type calcium channels: cell-based assay in high-throughput format, *Anal Biochem* 327, 74-81.
143. Yang, H., Zhang, N., Li, X., Chen, J., and Cai, B. (2009) Structure-activity relationships of diverse annonaceous acetogenins against human tumor cells, *Bioorg Med Chem Lett* 19, 2199-2202.
144. Ye, Q., Alfonso, D., Evert, D., and McLaughlin, J. L. (1996) Longifolicin, longicorcin, and gigantetronenone, three novel bioactive mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Asimina longifolia* (Annonaceae), *Bioorg Med Chem* 4, 537-545.
145. Yuan, S. S., Chang, H. L., Chen, H. W., Yeh, Y. T., Kao, Y. H., Lin, K. H., Wu, Y. C., and Su, J. H. (2003) Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway, *Life Sci* 72, 2853-2861.
146. Zafra-Polo, M. C., Gonzalez, M. C., Estornell, E., Sahpaz, S., and Cortes, D. (1996) Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I, *Phytochemistry* 42, 253-271.
147. Zamzami, N., and Kroemer, G. (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 67-71.
148. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S. A., Petit, P. X., Mignotte, B., and Kroemer, G. (1995) Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death, *J Exp Med* 182, 367-377.
149. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssiere, J. L., Petit, P. X., and Kroemer, G. (1995) Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo, *J Exp Med* 181, 1661-1672.

150. Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis, *J Exp Med* 183, 1533-1544.
151. Zhang, J. H., Chung, T. D., and Oldenburg, K. R. (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays, *J Biomol Screen* 4, 67-73.
152. Zhu, X. F., Liu, Z. C., Xie, B. F., Li, Z. M., Feng, G. K., Xie, H. H., Wu, S. J., Yang, R. Z., Wei, X. Y., and Zeng, Y. X. (2002) Involvement of caspase-3 activation in squamocin-induced apoptosis in leukemia cell line HL-60, *Life Sci* 70, 1259-1269.
153. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3, *Cell* 90, 405-413.